MARȚIAN COTRĂU
MARIA PROCA

TOXICOLOGIE ANALITICĂ

EDITURA MEDICALĂ

Scanned with OKEN Scanner

Conf. dr. doc. MARȚIAN COTRĂU Asist. dr. MARIA PROCA

615.9
C79

TOXICOLOGIE ANALITICĂ

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Pag.

Cuvînt înainte 7
Măsuri de prim ajutor în accidentele de laborator 9

I. Metode generale de izolare a toxicilor

I.1. IZOLAREA TOXICILOR DIN AER 17
I.2. IZOLAREA TOXICILOR DIN PRODUSE BIOLOGICE ȘI ALTE PRODUSE . . 28
I.2.1. Izolarea toxicilor volatili 30
I.2.2. Izolarea toxicilor minerali 34
I.2.3. Izolarea toxicilor organici nevolatili 42

II. Metode de determinare a toxicilor

II.1. DETERMINAREA UNOR NEMETALE ȘI A COMPUȘILOR LOR 53
II.1.1. Clorul 53
II.1.2. Bromul 57
II.1.3. Fluorul 58
II.1.4. Iodul 62
II.1.5. Hidrogenul sulfurat 63
II.1.6. Dioxidul de sulf 66
II.1.7. Amoniacul 71
II.1.8. Oxizii de azot 73
II.1.9. Hidrogenul fosforat 77
II.1.10. Compușii arsenului 78
II.1.11. Acetilena 84
II.1.12. Oxidul de carbon 87
II.2. DETERMINAREA UNOR METALE ȘI A COMPUȘILOR LOR 99
II.2.1. Mercurul 99
II.2.2. Plumbul și plumbtetraetilul 103
II.2.3. Bismutul 116
II.2.4. Stibiul 117
II.2.5. Staniul 120
II.2.6. Cuprul 121
II.2.7. Cadmiul 122
II.2.8. Nichelul și nichelcarbonilul 126
II.2.9. Cromul 129
II.2.10. Manganul 133
II.2.11. Zincul 135
II.2.12. Bariul 137
II.2.13. Taliul 137
II.3. DETERMINAREA UNOR ACIZI, BAZE ȘI SĂRURI 138
II.3.1. Acizi 138
II.3.2. Baze 140
II.3.3. Săruri 140

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

II.4. DETERMINAREA UNOR SUBSTANȚE ORGANICE VOLATILE 142
II.4.1. Hidrocarburile aromatice 142
II.4.2. Hidrocarburile alifatice halogenate 150
II.4.3. Alcoolii și glicolii 160
II.4.4. Fenolul 171
II.4.5. Aldehidele 175
II.4.6. Acetona 181
II.4.7. Eterul etilic 183
II.4.8. Esterii 184
II.4.9. Sulfura de carbon 188
II.4.10. Mercaptanii 191
II.4.11. Nitrobenzenul 192
II.4.12. Aminele aromatice 194
II.4.13. Acidul cianhidric și derivați 204

II.5. DETERMINAREA UNOR ALCALOIZI 214
II.5.1. Reactivii generali ai alcaloizilor 214
II.5.2. Morfina, codeina, tebaina, derivați de semisinteză și sinteză 220
II.5.3. Papaverina, noscapina (narcotina) și narceina 229
II.5.4. Chinina și chinidina 231
II.5.5. Stricnina și brucina 234
II.5.6. Rezerpina 239
II.5.7. Fizostigmina (ezerina) și neostigmina 240
II.5.8. Yohimbina 240
II.5.9. Alcaloizii din ergotul de secară 241
II.5.10. Atropina, hiosciamina și scopolamina 243
II.5.11. Cocaina 245
II.5.12. Nicotina 246
II.5.13. Coniina 248
II.5.14. Pilocarpina 249
II.5.15. Aconitina 250
II.5.16. Colchicina 251
II.5.17. Veratrina 252
II.5.18. Solanina și solanidina 253

II.6. DETERMINAREA UNOR MEDICAMENTE 255
II.6.1. Derivații barbiturici 255
II.6.2. Glutetimida 265
II.6.3. Sulfamidele antibacteriene 266
II.6.4. Glicozizii cardiotonici 268
II.6.5. Derivații acidului salicilic 271
II.6.6. Derivații p. aminofenolului 275
II.6.7. Derivații pirazolonei 277
II.6.8. Metilxantinele 279
II.6.9. Fenitoina 281
II.6.10. Meprobamatul 283
II.6.11. Benzodiazepinele 287
II.6.12. Fenotiazinele 293
II.6.13. Antidepresivele inhibitoare ale monoaminooxidazei (IMAO) 299
II.6.14. Antidepresivele triciclice 302
II.6.15. Amfetaminele psihotonice 310
II.6.16. Izoniazida 316
II.6.17. Clorochina 318

II.7. DETERMINAREA UNOR PESTICIDE 319
II.7.1. Diclordifeniltricloretanul (DDT) 319
II.7.2. Hexaclorciclohexanul (HCH) 324
II.7.3. Aldrinul, dieldrinul și endrinul 330
II.7.4. Paration ul 332
II.7.5. Malationul 339
II.7.6. Colinesteraza 341

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

II.7.7. Metilmercurul 345
II.7.8. Dinitro-orto-crezolul (DNOC) 347
II.7.9. Atrazinul și prometrinul 350
II.7.10. Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D) 357
II.7.11. Alfa-naftiltioureea (ANTU) 362
II.7.12. Warfarina 364

II.8. ALTE DETERMINĂRI 367

II.8.1. Micotoxinele 367
II.8.2. Hidrocarburile policiclice aromatice (HPA) 372
II.8.3. Cannabis 374
II.8.4. Dietilamida acidului lisergic (LSD) 376
II.8.5. Detergenții anionici 378
II.8.6. Detergenții cationici 381
II.8.7. Apiolul 382
II.8.8. Picrotoxina 383
II.8.9. Cantaridina 384
II.8.10. Gama-glutamilpeptidaza (gama-GT) 385

Anexa 1. Convertirea concentrațiilor gazelor și vaporilor exprimați în volume, în concentrații exprimate în greutate, și invers 389

Anexa 2. Concentrațiile maxime admise de substanțe toxice în atmosfera zonei de muncă 394

Anexa 3. Scrierea executării analizelor toxicologice de urgență (după Meunier) 400

Bibliografie selectivă 401

Scanned with OKEN Scanner

CUVÎNT ÎNAINTE

„USUS PLURA TE DOCEBIT"
(Practica te va învăța mai mult)

Chimizarea vieții moderne favorizează pătrunderea ubicuitară a toxicilor, sub cele mai variate și insidioase forme și concentrații. Aceasta, pentru că, deși promotor al progresului, chimia, „cheie a unui trai mai bun", generează, prin caracterul dialectic al oricărui fenomen, și efecte negative.

Printre efectele negative se înscriu și intoxicațiile, atît acute, cît și cronice. Înmulțirea și diversificarea lor, ca etiologie și manifestări, a modificat tabloul clasic al morbidității și mortalității, astfel încît, în prezent, intoxicațiile se înscriu printre primele cauze ale acestora.

În lupta de combatere și prevenire a intoxicațiilor — „un gram de profilaxie valorează mai mult decît o tonă de terapie" — determinarea calitativă și cantitativă a toxicilor a devenit, în epoca actuală, o preocupare majoră și permanentă.

În această idee, ne-am propus să elaborăm un ghid de toxicologie analitică, în care am inclus metodele de determinare uzuală a toxicilor mai frecvent întîlniți. Ca în orice multitudine de date, și aici s-a impus o clasificare a materialului divers, atît ca metode de izolare, cît și ca natură a toxicilor. De aceea, volumul „Toxicologie analitică" este structural în două părți.

Partea I, „Metode generale de izolare a toxicilor" se ocupă de izolarea lor în raport cu mediul în care se găsesc : aer sau produse biologice (urină, sînge, organe etc.), precum și alte produse (corp delict, apă, alimente, medicamente etc.).

Partea a II-a, „Metode de determinare a toxicilor" cuprinde descrierea metodelor de izolare, identificare și dozare a toxicilor grupați în următoarele categorii : nemetale și compușii lor ; metale și compușii lor ; acizi, baze și săruri ; substanțe organice volatile ; alcaloizi ; medicamente ; pesticide ; alte determinări.

În alegerea metodelor am ținut seama în primul rînd, de posibilitatea de dotare a majorității laboratoarelor de toxicologie, astfel încît ponderea majoră o reprezintă metodele spectrofotometrice. Pentru toxicii din mediul industrial și comunal am folosit cu precădere metodele recomandate de Ministerul Sănătății. Pentru determinări rapide — atît de necesare uneori — am inclus și metode colorimetrice

Scanned with OKEN Scanner

liniare de tip tub Dräger. Totodată am expus și principiile de funcționare ale aparaturii moderne : analizoare de gaze care asigură recoltarea, depistarea și dozarea toxicilor.

O atenție deosebită a fost acordată și determinării medicamentelor, alcaloizilor și pesticidelor, dată fiind frecvența crescîndă a intoxicațiilor de această natură. De asemenea, a fost inclusă și o grupă de determinări pentru toxici variați, cuprinzînd agenții cancerigeni, unele droguri halucinogene, detergenți etc.

Pentru urmărirea biotoxicologică a unor intoxicații a fost introdusă și determinarea cîtorva activități enzimatice, indicatori precoci ai acțiunii toxice, ca ALA-dehidraza, colinesteraza, gama-GT, a precursorilor hemoglobinei, ca porfirine urinare, porfobilinogen, acid delta-amino-levulinic și a altor compuși rezultați din impactul toxic-organism, ca methemoglobina și carboxihemoglobina.

La monografiile toxicilor, rezultatele analitice au fost interpretate prin referire la normativele sanitare în vigoare (CMA) pentru toxicii industriali și comunali. Pentru medicamente, alcaloizi și pesticide s-au interpretat rezultatele, acolo unde a fost posibil, prin prisma concentrațiilor din produsele biologice corelate cu manifestările clinice, date utile pentru dirijarea tratamentului antidotic.

Cunoscînd, dintr-o practică îndelungată, riscurile muncii de laborator, volumul „Toxicologie analitică" debutează cu un scurt capitol conținînd măsuri de prim ajutor în intoxicațiile curente și în accidente de laborator.

La sfîrșitul volumului am inclus anexe privind : transformarea concentrației toxicilor din aer din mg/litru în ppm și invers ; tabelul cu concentrațiile maxime admise ; o schemă cu serierea executării analizelor toxicologice de urgență, utilă cu deosebire toxicologilor din secțiile de toxicologie clinică.

În redactarea materialului am folosit o bibliografie bogată și, acolo unde s-a pretat, figuri și tabele sinoptice.

Volumul „Toxicologie analitică" va fi util specialiștilor implicați în combaterea intoxicațiilor, și în special a toxicologilor sanitari, industriali, legiști, clinici.

Autorii vor fi recunoscători tuturor acelora care le vor semnala erori sau lipsuri.

AUTORII

9 aprilie 1986

Scanned with OKEN Scanner

MĂSURI DE PRIM AJUTOR ÎN ACCIDENTELE DE LABORATOR

Accidentele de laborator trebuie să beneficieze, în prima etapă, de măsuri de prim ajutor acordate la locul accidentului. De obicei, de promptitudinea și eficiența acestor măsuri depinde evoluția intoxicației. După acordarea acestora, victima va fi evacuată spre o unitate sanitară, pentru a primi tratamentul adecvat.

În continuare vor fi expuse unele măsuri de prim ajutor în cazul celor mai frecvente accidente care pot surveni în laboratoarele de chimie.

I. ARSURI CHIMICE

1. *Acizii corosivi* (sulfuric, azotic, acetic, clorhidric, fluorhidric, oxalic etc.).

Acizii corosivi provoacă, prin contact, necroză de coagulare a țesuturilor. Unii acizi corosivi (fluorhidric, oxalic) au, în plus, și acțiune generală, după trecerea în circulație.

a. *Acidul sulfuric*

Contact cutanat

— se spală tegumentele cu multă apă de robinet, în jet, timp de 15 minute. Dacă îmbrăcămintea este contaminată, se începe spălarea pe sub îmbrăcăminte (pentru a cîștiga timp) și apoi (sau concomitent) se îndepărtează aceasta.

Este contraindicată spălarea cu soluții alcaline neutralizante (de exemplu, bicarbonat de sodiu), care, în contact cu acidul, dezvoltă căldură, agravînd arsurile chimice.

Contact cu globii oculari

— se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 5—15 minute;

Scanned with OKEN Scanner

— se instilează 2—3 picături de cocaină soluție 1% ;

— se trimite de urgență la serviciul de oftalmologie.

Ingestie

— se dă imediat accidentatului să ingere 2—3 litri apă de robinet, fracționat, și se provoacă vărsături de fiecare dată, prin excitarea mecanică a fundului gîtului. Această măsură are rolul de a dilua acidul ingerat și trebuie aplicată cu maximă urgență, deoarece mai tîrziu — în cazurile grave — actul deglutiției nu mai este posibil ;

— numai după ingerarea de apă se poate administra antidotul antiacid, 40 g oxid de magneziu (magnesia usta) în 1 000 ml apă (suspensie apoasă 4%) ;

— pentru calmarea durerilor moderate se administrează algocalmin, 3—4 fiole a 2 ml soluție 50% i.m. sau i.v. Pentru dureri mari se administrează — dacă accidentatul nu este în stare de șoc — o fiolă de mialgin i.m., pînă la acordarea ajutorului medical.

Sînt contraindicate : — evacuarea conținutului gastric prin provocare de vărsături la accidentatul în stare comatoasă ; — administrarea orală de bicarbonat sau carbonat de sodiu, deoarece, în contact cu acidul, degajă dioxid de carbon, provocînd distensie gastrică, soldată uneori cu perforația peretelui stomacal, deja lezat.

Inhalare

— se evacuează accidentatul din mediul toxic și i se îndepărtează îmbrăcămintea contaminată ;

— se aplică oxigenoterapia ;

— se menține în repaus (risc de edem pulmonar) și se transportă la spital în poziție de decubit ;

— dacă accidentatul este în stare comatoasă se eliberează căile respiratorii superioare (v. Intoxicații : oxidul de carbon).

b. *Acidul azotic*

Se procedează ca la acidul sulfuric. În plus, la inhalare de vapori nitroși, accidentatul trebuie menținut în stare de repaus, apoi internat la spital, chiar dacă nu prezintă simptome și semne de intoxicație.

c. *Acidul acetic*

Se procedează ca la acidul sulfuric.

d. *Acidul clorhidric*

Contact cutanat

— se spală tegumentele cu multă apă de robinet, în jet, timp de 15 minute. Dacă îmbrăcămintea e te contaminată, se începe spălarea pe sub îmbrăcăminte (pentru a cîștiga timp) și apoi (sau concomitent) se îndepărtează aceasta ;

— se introduce porțiunea afectată în alcool etilic 70%, care conține bucățele de gheață, timp de 1—4 ore, sau se aplică comprese care conțin, între straturile de tifon, bucățele de gheață în alcool etilic 70% ;

— se trimite imediat la spital pentru excizarea veziculelor, tratarea leziunilor subungheale etc.

Scanned with OKEN Scanner

Contact cu globii oculari

— se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 5—15 minute;

— se instilează 2—3 picături de cocaină soluție 1%;

— se trimite de urgență accidentatul la serviciul de oftalmologie.

Ingestie

Se procedează la fel ca la acidul sulfuric.

Inhalare

Se procedează ca la acidul azotic.

c. *Acidul fluorhidric*

Contact cutanat

— se spală tegumentele cu multă apă de robinet, în jet, timp de 15—60 minute. Dacă îmbrăcămintea este contaminată, se începe spălarea pe sub îmbrăcăminte (pentru a cîștiga timp) și apoi (sau concomitent) se îndepărtează aceasta;

— se acoperă tegumentele lezate cu o pastă de oxid de magneziu care conține 20% glicerină;

— se trimite imediat accidentatul la spital pentru excizarea veziculelor, tratarea leziunilor subungheale etc.

Contact cu globii oculari

— se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 15 minute;

— se irigă sacul conjunctival cu ser fiziologic timp de 30—60 minute;

— se instilează 2—3 picături de cocaină, soluție 1%;

— se trimite de urgență la serviciul de oftalmologie.

Ingestie

— se dă imediat accidentatului să ingere 2—3 litri de apă de robinet, fracționat, și se provoacă vărsături de fiecare dată, prin excitarea mecanică a fundului gîtului. Această măsură are rolul de a dilua acidul ingerat și trebuie aplicată cu maximă urgență, deoarece mai tîrziu — în cazurile grave — actul deglutiției nu mai este posibil;

— antidotul este gluconat de calciu sau clorură de calciu soluție 10—20%, în doză inițială de 10 ml, i.v., care se repetă de mai multe ori. Această măsură are rolul de a inactiva acidul fluorhidric deja absorbit;

— se administrează lapte sau smîntînă în doză de 150—200 ml; doza se repetă după 4 ore (dacă accidentatul nu a fost încă evacuat). Această măsură are rolul de a opri avansarea leziunilor necrotice la nivelul esofagului și stomacului.

Este contraindicată evacuarea conținutului gastric prin provocare de vărsături la accidentatul în stare comatoasă.

Scanned with OKEN Scanner

Inhalare

Se procedează ca la acidul azotic.

f. *Acidul oxalic*

Ingestie

— se administrează oral 30 g lactat de calciu, gluconat de calciu sau carbonat de calciu în 1 000 ml apă, sau, în lipsa acestora, lapte, apoi se provoacă vărsături ;

— se administrează gluconat de calciu sau clorat de calciu în doză inițială de 10 ml din soluție 10—20 % i.v., doză care se repetă de mai multe ori. Această măsură are rolul de a inactiva acidul oxalic deja absorbit.

I. *Bazele caustice* (hidroxizii de sodiu și de potasiu, carbonații de sodiu și de potasiu, hidroxidul de amoniu etc.).

Bazele caustice provoacă, prin contact, necroză de lichefiere a țesuturilor.

Contact cutanat

— se spală tegumentele cu multă apă de robinet, în jet, timp de 15 minute. Dacă îmbrăcămintea este contaminată, se începe spălarea pe sub îmbrăcăminte (pentru a cîștiga timp) și apoi (sau concomitent) se îndepărtează aceasta.

Contact cu globii oculari

— se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 5—15 minute ;

— se instilează 2—3 picături de cocaină, soluție 1 % ;

— se trimite de urgență la serviciul de oftalmologie.

Ingestie

— se dă imediat accidentatului să ingere 2—3 litri apă de robinet, fracționat, și se provoacă vărsături de fiecare dată, prin excitarea mecanică a fundului gîtului. Această măsură are rolul de a dilua baza caustică ingerată și trebuie aplicată cu maximă urgență, deoarece mai tîrziu — în cazurile grave — actul deglutiției nu mai este posibil ;

— numai după ingerarea de apă se poate administra antidotul antibazic, 500—1 000 ml acid acetic 1 % sau oțet 20 % (oțet comestibil diluat 1/5) ;

— pentru calmarea durerilor moderate se administrează algocalmin, 3—4 fiole a 2 ml soluție 50 % i.m. sau i.v. Pentru dureri mari se administrează — dacă accidentatul nu este în stare de șoc — o fiolă de mialgin i.m., pînă la acordarea ajutorului medical.

Este contraindicată evacuarea conținutului gastric prin provocare de vărsături la accidentatul în stare comatoasă.

Inhalare

Inhalarea de amoniac (NH_3) și de hidroxid de amoniu (NH_4OH) determină o intoxicație asemănătoare aceleia cu clor. Tratamentul de urgență este identic (v. Intoxicații : clorul).

II. INTOXICAȚII

1. *Oxidul de carbon*

— se evacuează intoxicatul din mediul toxic ;

— se asigură, la intoxicatul comatos, libertatea căilor aeriene prin : ștergerea cavității bucale ; scoaterea eventualei proteze dentare ; menținerea gurii întredeschise și fixarea limbii astfel încît să se împiedice alunecarea ei posterioară ; asigurarea poziției de decubit lateral, cu capul în hiperextensie și sub nivelul trunchiului, ceea ce permite scurgerea lichidelor de secreție și previne inhalarea mucozităților ;

— se aplică oxigenoterapia ;

— se practică respirația artificială „gură la gură" în cazul deprimării sau oririi respirației.

2. *Clorul*

— se evacuează intoxicatul din mediul toxic ; și se îndepărtează îmbrăcămintea contaminată ;

— se asigură, la intoxicatul comatos, libertatea căilor aeriene (v. Oxidul de carbon) ;

— se aplică oxigenoterapia ;

— se menține intoxicatul în stare de repaus (risc de edem pulmonar).

3. *Hidrogenul sulfurat*

— se evacuează intoxicatul din mediul toxic și se îndepărtează îmbrăcămintea contaminată.

— se asigură, la intoxicatul comatos, libertatea căilor aeriene (v. Oxidul de carbon) ;

— se aplică oxigenoterapia ;

— se practică respirația artificială (procedeul „gură la gură" este periculos pentru salvator) ;

— se menține intoxicatul în stare de repaus (risc de edem pulmonar tardiv) ;

— se administrează 10 ml nitrit de sodiu soluție 3%, i.v. lent, repetîndu-se încă de două ori — deci în total 30 ml (aproximativ 1 g nitrit de sodiu) ;

— în caz de stropire în ochi, se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 5—15 minute ; se instilează o picătură de ulei comestibil, 2—3 picături soluție 1% de cocaină (la dureri mari) și cîte 3—4 picături soluție 0,1% de adrenalină la fiecare 5 minute (la hipertermie puternică) ; se trimite accidentatul de urgență la serviciul de oftalmologie.

4. *Hidrogenul arseniat*

— se evacuează intoxicatul din mediul toxic și se îndepărtează îmbrăcămintea contaminată ;

— se asigură, la intoxicatul comatos, libertatea căilor aeriene ;

Scanned with OKEN Scanner

— se aplică oxigenoterapia ;

— se practică respirația artificială (procedeul „gură la gură" este periculos pentru salvator) ;

— intoxicația fiind foarte gravă și neexistînd alte modalități de prim ajutor la locul accidentului, se evacuează intoxicatul de urgență spre o unitate sanitară specializată.

5. *Acidul cianhidric și cianurile*

— tratamentul se instituie cu urgența maximă ;

— indiferent de calea de intoxicare dacă intoxicatul este *conștient*, i se dă să inspire, din 30 în 30 secunde, conținutul unei fiole de nitrit de amil cu care s-a impregnat un tampon de vată (batistă). Se repetă operația din 5 în 5 minute și se întrerupe cînd tensiunea arterială scade sub 80 mm Hg. Concomitent, se administrează 10 ml nitrit de sodiu soluție 3% i.v. lent și 50 ml tiosulfat de sodiu, soluție 20%, pînă la doza totală i.v. lent ;

— dacă intoxicatul este *inconștient*, se aplică respirația artificială (procedeul „gură la gură" este periculos pentru salvator) și se administrează ritrit de sodiu și tiosulfat de sodiu, ca mai sus ;

— în intoxicația prin *inhalare*, primul timp este, desigur, evacuarea intoxicatului din mediul toxic, apoi se procedează ca mai sus ;

— în intoxicația prin *ingestie*, după ce s-a aplicat tratamentul cu nitrit de amil, nitrit de sodiu și tiosulfat, ca mai sus, se dă intoxicatului să ingere 1 litru permanganat de potasiu 1/5 000, și se provoacă vărsături ; în final se dă să ingere 1 litru apă de robinet (permanganatul este iritant al mucoasei digestive, de aceea trebuie îndepărtate urmele de soluție din stomac).

Este contraindicată evacuarea conținutului gastric prin vărsături la intoxicatul în stare comatoasă.

6. *Alcoolul metilic*

— se administrează imediat 100 ml alcool etilic soluție 50%, oral, (aproximativ 50 g alcool etilic 96%), apoi cîte 20 ml alcool etilic 50% (aproximativ 10 g alcool etilic 96%) la fiecare oră ;

— se protejează globii oculari de lumina puternică printr-un bandaj oclusiv ; se trimite de urgență la serviciul de oftalmologie ;

— se administrează 5—10 g bicarbonat de sodiu oral, la fiecare oră.

7. *Insecticide organofosforate, tip paration*

— tratamentul se instituie cu urgența maximă, deoarece intervalul dintre apariția primelor manifestări și instalarea semnelor de intoxicație gravă este scurt (10—40 minute) încît orice întîrziere periclitează viața intoxicatului ;

— indiferent de calea de intoxicare, pînă la evacuarea spre o unitate medicală specializată, se începe tratamentul cu *atropină*, în doze de 1—5 mg i.v. imediat, apoi cîte 1—5 mg i.v., i.m. la intervale de 5, 10, 20, 30 minute (după gravitatea cazului), pînă la apariția primelor semne de atropinizare

(uscăciunea gurii, midriază, tahicardie peste 90—100 bătăi/minut). Este important ca atropina să nu fie subdozată. Supradozarea se manifestă prin agitație, halucinații auditive și vizuale și se combate cu pilocarpină, 1—2 fiole s.c. Dacă evacuarea este destul de rapidă, *reactivatorii colinesterazei* (PAM și Toxogonin) vor fi administrați la centrul specializat.

În intoxicația prin *inhalare* sau *contact cutanat*:

— se evacuează intoxicatul din mediul toxic și se îndepărtează îmbrăcămintea contaminată;

— se spală tegumentele cu multă apă și săpun, timp de 15 minute;

— se asigură, la intoxicatul comatos, libertatea căilor aeriene (v. Oxidul de carbon);

— se aplică oxigenoterapia;

— se practică respirația artificială (procedeul „gură la gură" este periculos pentru salvator).

În intoxicația prin *contact cu globii oculari*:

— se spală sacul conjunctival cu multă apă de robinet, în jet cu presiune mică, menținînd pleoapele îndepărtate de globii oculari, timp de 15 minute, apoi cu bicarbonat de sodiu soluție 5%;

În intoxicația prin *ingestie*:

— dacă intoxicatul este conștient, i se dă să ingere apă de robinet, 2—3 litri, fracționat, și se provoacă vărsături de fiecare dată, prin excitarea mecanică a fundului gîtului. Este preferabil să se folosească în loc de apă, suspensie de cărbune activat în soluție de bicarbonat de sodiu 5%; în toate cazurile, salvatorul va purta mănuși de protecție.

Este contraindicată administrarea de: lapte sau ulei; narcotice, barbiturice sau alte deprimante ale respirației.

III. CONTUZII ȘI TRAUMATISME DESCHISE

1. *Contuziile profunde* (cu rupturi musculare, osoase etc.) necesită evacuarea de urgență spre o unitate sanitară specializată.

2. *Traumatismele deschise* (plăgi) impun, la locul accidentului, aplicarea unui pansament de protecție (comprese de tifon) și bandajarea (fixarea pansamentului) cu fașă, leucoplast, batistă etc.

3. *Plăgi însoțite de hemoragie* necesită tamponarea locală și fixarea pansamentului cu un bandaj compresiv. Dacă sîngele nu se oprește, se suprapune un al doilea bandaj compresiv. Dacă operația aceasta nu a reușit și dacă plaga este localizată la nivelul membrelor, se aplică un garou cu cîțiva cm mai sus față de nivelul plăgii. Garoul este însoțit de o notă pe care se indică ora aplicării lui, deoarece nu poate fi menținut mai mult de 2 ore (pericol de gangrenă), iar din 15 în 15 minute va fi relaxat puțin, timp de 1—2 minute.

Scanned with OKEN Scanner

IV. ELECTROCUTĂRI

Victima nu se poate desprinde singură de elementul electric, din cauza contracturii puternice a mușchilor. De asemenea, mișcările respiratorii fiind împiedicate de rigiditatea toracică, se instalează sincopa respiratorie, iar perturbările activității cordului determină apariția sincopei cardiace.

Măsurile de prim ajutor vizează :

— *desprinderea victimei de sub tensiune,* prin întreruperea curentului electric ; dacă aceasta nu este posibil, salvatorul nu va încerca desprinderea direct cu mîna (poate fi el însuși electrocutat), ci cu ajutorul unui corp neconducător de electricitate : o haină groasă și uscată, mănuși de cauciuc, sau un baston (băț) de lemn ; nu se ating părțile descoperite ale corpului victimei ci numai îmbrăcămintea ;

— *resuscitarea cardiorespiratorie* prin respirație artificială și, la nevoie, masaj cardiac, care se continuă pe tot timpul transportului spre spital (serviciul de terapie intensivă).

Scanned with OKEN Scanner

METODE GENERALE DE IZOLARE A TOXICILOR

I.1. IZOLAREA TOXICILOR DIN AER

Toxicii din aer sînt detectați din atmosfera poluată sau determinați după recoltarea probelor de aer.

Detecția se realizează cu ajutorul hîrtiilor, creioanelor sau tuburilor indicatoare.

— *Hîrtii indicatoare* : se impregnează benzi sau rondele de hîrtie de filtru cu un reactiv adecvat și se expun în atmosfera poluată sau se aspiră aerul de cercetat prin ele. Toxicul este detectat prin modificarea culorii — rezultată din reacția dintre toxic și reactiv — sau determinat semicantitativ prin : timpul necesar apariției culorii (metodă statică), volumul de aer aspirat, lungimea porțiunii colorate, intensitatea colorației (metodă dinamică). Sensibilitatea metodei se mărește, dacă are loc pe o suprafață mică de hîrtie. În tehnica cu pîlnia Palmer, aerul este aspirat printr-o rondelă de hîrtie de filtru, impregnată cu reactiv și fixată între flanșele pîlniei. Pata formată este comparată cu petele-etalon, naturale (obținute cu toxicul corespunzător, dacă colorația este stabilă) sau artificială (reproduse în acuarelă pe hîrtie de filtru cu pori mici).

— *Creioane indicatoare* : se include reactivul într-un material de umplutură amestecat cu un liant, totul modelat sub formă de creion. În atmosfera de cercetat se trasează o linie cu creionul, pe hîrtie, lemn etc. și se deduce prezența sau chiar concentrația aproximativă a toxicului prin modificarea colorației liniei trasate. Metoda, modernă și extrem de simplă, are și avantajul stabilității față de hîrtia indicatoare, deoarece creionul are o suprafață mai mică de degradare a reactivului.

— *Tuburi indicatoare* : se impregnează cu reactiv o pulbere absorbantă (silicagel, porțelan), conținută într-un tub de sticlă. La aspirarea aerului, culoarea se modifică, datorită reacției dintre reactiv și toxic. Concentrația toxicului, citită pe o scară gradată liniară, este proporțională cu lungimea stratului colorat. Astfel de aparate simple, portabile, pentru determinarea

BIBLIOTECA JUDEȚEANĂ „GH ASACHI" IAȘI

531.452

Scanned with OKEN Scanner

rapidă semicantitativă a unor toxici din aer, sînt analizoarele universale UG-1 și UG-2, constituite dintr-un dispozitiv de absorbție a aerului, tuburi indicatoare specifice fiecărui toxic și o trusă de accesorii pentru prepararea tuburilor indicatoare. De o construcție similară sînt tuburile Dräger, Auer etc.

Recoltarea probelor de aer se realizează prin mai multe procedee.

A. **Recoltarea în recipiente închise** (procedeul de moment)

Procedeul este indicat pentru recoltarea toxicilor în concentrație mare. Se utilizează recipiente de diferite forme, capacități și dimensiuni, avînd însă volum cunoscut, și anume :

— *flacoane de sticlă* : flacoane cu dop străbătut de un tub lung (sifon) și altul scurt, prevăzute cu robinete, prin care se poate face, la nevoie, vid ; flacoane cu tubulură în T ; flacoane simple cu dop rodat (fig. 1, a. b);

— *pipete de gaz* (tonometre) : tuburi de sticlă de 200—500 ml, avînd la ambele extremități robinete sau tuburi de cauciuc închise cu perle sau baghete de sticlă, sau cu cleme Hoffmann (fig. 2) ;

— *camere, saci, baloane de cauciuc sau de material plastic* : au o utilizare limitată, deoarece unii toxici difuzează prin membrana de cauciuc (CO_2), alții sînt absorbiți de aceasta (SO_2) etc.

Recoltarea în aceste recipiente se poate face prin trei modalități, în raport cu proprietățile toxicului și caracteristicile recipientului.

1. *Recoltarea prin dislocuire de lichid*

Se umple complet cu apă flaconul cu dop rodat, pipeta de gaz etc. și se golesc la locul de recoltare, cînd aerul de cercetat pătrunde în locul apei. Metoda se folosește atunci cînd toxicul nu reacționează cu apa.

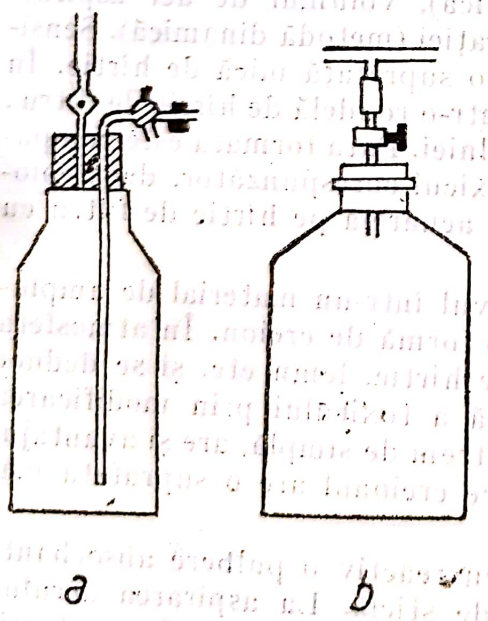


Fig. 1 — *a*, Flacon cu dop străbătut de un tub lung și altul scurt ; *b*, Flacon cu tubulură în T.

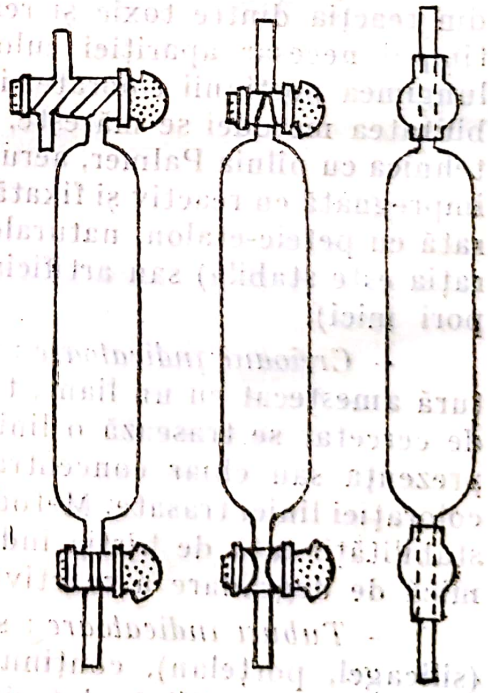


Fig. 2 — Tonometre.

rapidă semicantitativă a unor toxici din aer, sînt analizoarele universale UG-1 și UG-2, constituite dintr-un dispozitiv de absorbție a aerului, tuburi indicatoare specifice fiecărui toxic și o trusă de accesorii pentru prepararea tuburilor indicatoare. De o construcție similară sînt tuburile Dräger, Auer etc.

Recoltarea probelor de aer se realizează prin mai multe procedee.

A. **Recoltarea în recipiente închise** (procedeul de moment)

Procedeul este indicat pentru recoltarea toxicilor în concentrație mare. Se utilizează recipiente de diferite forme, capacități și dimensiuni, avînd însă volum cunoscut, și anume :

— *flacoane de sticlă* : flacoane cu dop străbătut de un tub lung (sifon) și altul scurt, prevăzute cu robinete, prin care se poate face, la nevoie, vid ; flacoane cu tubulură în T ; flacoane simple cu dop rodat (fig. 1, a, b);

— *pipete de gaz* (tonometre) : tuburi de sticlă de 200—500 ml, avînd la ambele extremități robinete sau tuburi de cauciuc închise cu perle sau baghete de sticlă, sau cu cleme Hoffmann (fig. 2) ;

— *camere, saci, baloane de cauciuc sau de material plastic* : au o utilizare limitată, deoarece unii toxici difuzează prin membrana de cauciuc (CO_2), alții sînt absorbiți de aceasta (SO_2) etc.

Recoltarea în aceste recipiente se poate face prin trei modalități, în raport cu proprietățile toxicului și caracteristicile recipientului.

1. *Recoltarea prin dislocuire de lichid*

Se umple complet cu apă flaconul cu dop rodat, pipeta de gaz etc. și se golesc la locul de recoltare, cînd aerul de cercetat pătrunde în locul apei. Metoda se folosește atunci cînd toxicul nu reacționează cu apa.

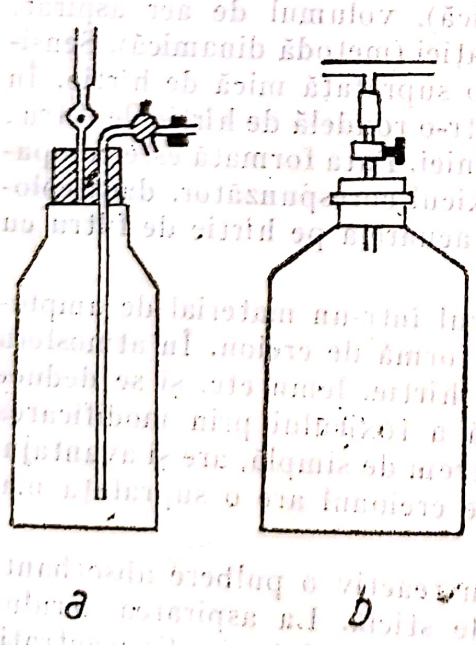


Fig. 1 — *a*, Flacon cu dop străbătut de un tub lung și altul scurt ; *b*, Flacon cu tubulură în T.

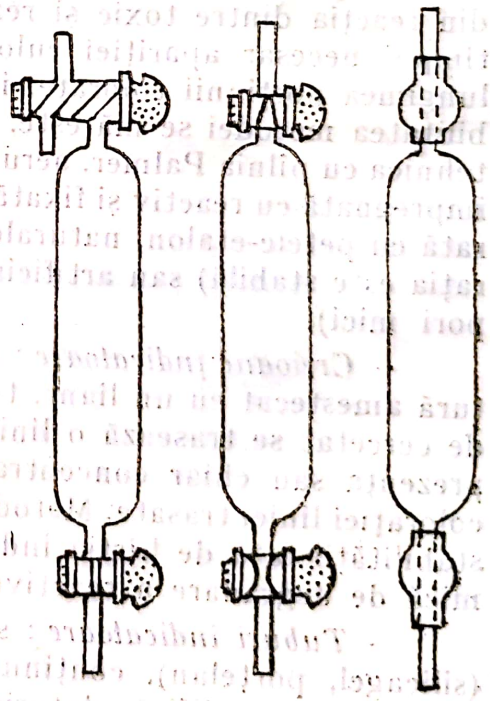


Fig. 2 — Tonometre.

2. *Recoltarea prin dislocuire de aer*

Se trece, prin tubul lung al flaconului, adaptat la un dispozitiv de aspirare, aer de cercetat, în timp ce aerul inițial iese prin tubul scurt. Se introduce un volum de aer de 10 ori mai mare decît volumul inițial, pentru a avea siguranța unei dislocuiri totale. Metoda se folosește atunci cînd toxicul reacționează cu apa.

3. *Recoltarea prin creare de vid*

Se creează vid în flaconul cu tubulură în T, în flaconul cu tubulură inegală, în pipeta de gaz, puse în legătură cu o pompă de vid, pînă cînd nu se mai observă scădere de presiune în manometru. Recipientul astfel vidat se deschide la locul de recoltare, cînd aerul de cercetat pătrunde în el. Metoda, simplă și rapidă, se folosește atunci cînd toxicul reacționează cu apa. Deoarece se creează numai un vid parțial, iar presiunea remanentă se poate măsura cu manometru, trebuie calculat volumul real de aer recoltat, folosind formula de mai jos :

$$V = V_1 \frac{P - Pr}{P}$$

în care :

V = volumul real de aer recoltat, în ml ;
V_1 = volumul recipientului, în ml ;
P = presiunea aerului, în mm Hg ;
Pr = presiunea remanentă, în mm Hg.

Recoltarea în recipiente închise are o utilizare limitată deoarece, pe de o parte, permite efectuarea numai a probelor de scurtă durată (probe de moment) iar pe de altă parte, de asemenea, nu se pot realiza concentrări ale toxicului, capacitatea maximă a recipientelor fiind de 5 litri.

B. **Recoltarea prin aspirare** (procedeul continuu)

Procedeul este indicat pentru recoltarea toxicilor în concentrație mică, deoarece prin aspirarea, în curent continuu, a unui volum de aer măsurat, printr-un mediu absorbant, toxicul se acumulează în acesta, ceea ce permite determinarea chiar a concentrațiilor mici.

Este necesară o aparatură constituită din : dispozitive de aspirare ; dispozitive de măsurare a volumului de aer aspirat ; dispozitive de reținere a toxicului. De obicei, dispozitivele de măsurare se interpun între cele de aspirare și de reținere.

1. *Dispozitive de aspirare*

Aerul se aspiră cu ajutorul dispozitivelor care creează depresiune în sistemul de reținere, urmată de pătrunderea aerului în acesta. În funcție de cantitatea de aer aspirată, se folosesc aspiratoare hidraulice (1 — 50 litri) sau mecanice (peste 100 litri).

a. *Aspiratoarele hidraulice* sînt utilizate atunci cînd există o sursă de apă, dar nu curent electric, și cînd se recoltează cu viteze mici, volume relativ mici de aer. Principalele aspiratoare hidraulice sînt :

Vasele comunicante (fig. 3 a și b) sînt două vase de sticlă sau metal cu capacități egale, gradate din 100 în 100 cm^3 și asamblate printr-un tub de cauciuc pe care se află o clemă, cu ajutorul căreia se reglează debitul de aspirare. Vasele comunică între ele printr-un dispozitiv de sifonare (fig. 3, *a*) sau prin orificii

Fig. 3 — a, b — Vase comunicante.

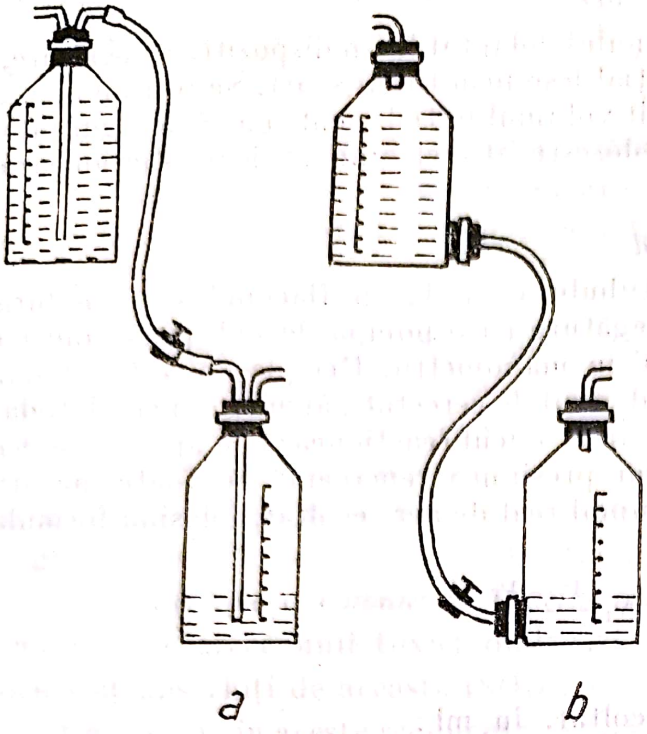
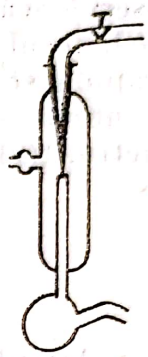


Fig. 4 — Trompă de apă.



laterale inferioare (fig. 3, *b*). Vasul superior se pune în legătură cu dispozitivul de reținere, se umple cu apă și se deschide clema. Datorită diferenței de nivel, apa curge în vasul inferior, făcînd vid în vasul superior și permițînd aspirarea aerului din exterior prin dispozitivul de reținere, în care se află mediul absorbant. Dacă este necesară aspirarea unui volum mai mare de aer decît capacitatea unui vas, se schimbă poziția vaselor între ele, de mai multe ori. Volumul aspirat este egal cu produsul dintre numărul vaselor golite și capacitatea acestora.

Trompa de apă (fig. 4) este formată dintr-un tub, care prin extremitatea sa superioară (1) se adaptează, direct sau prin intermediul unui tub de cauciuc, la un robinet de apă. În porțiunea mijlocie (2), tubul se efilează și pătrunde în alt tub, care se continuă pînă la extremitatea inferioară a trompei (4). În momentul scurgerii apei, la nivelul piesei (2), are loc o aspirare de aer. Curentul de aer pătrunde în trompă printr-un tub lateral (3), la care se adaptează dispozitivul de reținere.

b. *Aspiratoarele mecanice* sînt utilizate pentru recoltările de lungă durată. De obicei, la aspiratoarele cu debit mare se realizează o cale falsă între pompă și gazometru (fig. 5).

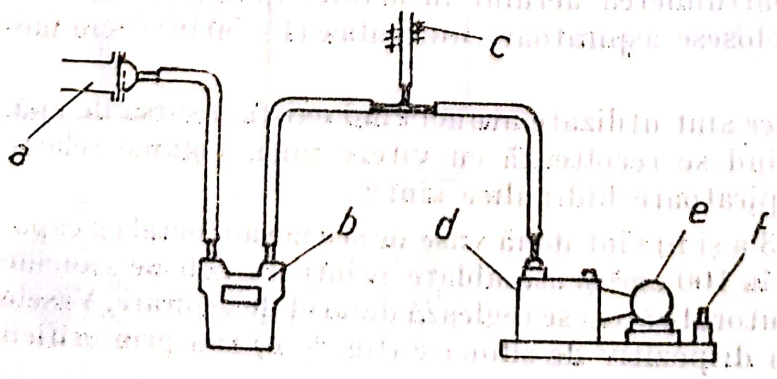


Fig. 5 — Instalație de recoltare a aerului cu aspiratoare mecanice.
a) Dispozitiv de reținere; *b)* gazometru; *c)* cale falsă pentru reglarea debitului; *d)* pompă aspiratoare; *e)* motorul pompei; *f)* comutator.

Scanned with OKEN Scanner

Aspiratoarele mecanice mai utilizate sînt :

Pompele de vid (manuale sau electrice) sînt utile pentru recoltarea volumelor mari de aer, însă au dezavantajul de a fi grele (incomode pentru teren) și supuse corodării prin vaporii acizi și alcalini, iar debitul de aer aspirat este ușor degrelat datorită emulsiei apă-ulei provocată de umiditatea excesivă.

Aspiratoarele de praf sînt pompe electrice de vid modificate, cu greutate redusă, debit mare de aspirare și ușor de manipulat. Pentru utilizare, se fixează la orificiul de aspirare un dop de cauciuc prin care trec două tuburi : unul, în legătură cu gazometrul și apoi cu dispozitivul de reținere, al doilea, în legătură cu exteriorul, spre a evita supraîncălzirea motorului. Aspiratoarele electrice trebuie să fie prevăzute cu dispozitive „anti-ex" (antiexplozive) pentru locurile de recoltare cu risc de explozie.

Pompele cu aer comprimat sînt indicate pentru locurile de recoltare cu risc de explozie și unde există instalație de aer comprimat.

2. *Dispozitivele de măsurare a volumului de aer*

Acestea sînt :

a. *Gazometrele (contoarele de gaz)* (fig. 6) indică volumul de aer aspirat, prin citire directă pe un cadran.

b. *Debitmetrele (reometrele și rotametrele)* (fig. 7 și 8) marchează debitul de aspirare, deci cantitatea de aer aspirat în unitatea de timp. Se notează timpul cît a durat aspirarea și se calculează volumul, prin multiplicarea debitului cu timpul.

Calculul volumului de aer adus la condiții normale

Deoarece temperatura și presiunea modifică sensibil volumul de aer, pentru a obține rezultate comparabile trebuie făcută corecția acestuia la condiții normale de temperatură și presiune, adică la 0°C și 760 mm Hg. Se utilizează ecuația de stare a gazelor perfecte :

$$P \cdot V = P_0 V_0 (1 + \alpha t) \qquad (1)$$

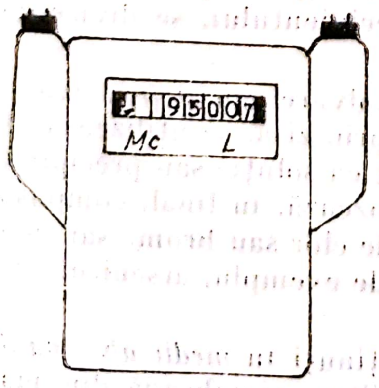


Fig. 6 — Gazometru.

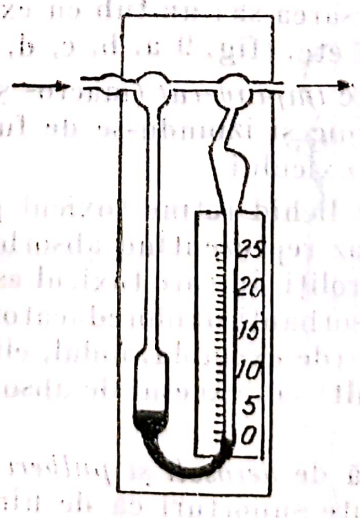


Fig. 7 — Reometru.

Fig. 8 — Rotametru.

în care:

P = presiunea aerului în momentul recoltării, în mm Hg;
P_0 = presiunea normală = 760 mm Hg;
V = volumul aerului aspirat, în litri;
V_0 = volumul aerului aspirat adus în condiții normale, în litri;
α = coeficientul de dilatare volumetrică a aerului = 1/273;
t = temperatura aerului în momentul recoltării, în °C.

din care rezultă:

$$V_0 = V \cdot \frac{P}{P_0} \cdot \frac{1}{(1 + \alpha t)} = V \cdot \frac{P}{760} \cdot \frac{273}{(273 + t)} \qquad (2)$$

Cunoscînd valorile lui V, P, t, se poate calcula V_0. Există tabele în care sînt calculate valorile $(1 + \alpha t)$ pentru diferite presiuni (P) și temperaturi (t).

Dacă pentru recoltare s-a folosit un recipient vidat, se introduce în calcul și presiunea remanentă, Pr, și formula (2) devine:

$$V_0 = V \cdot \frac{(P - Pr)}{760} \cdot \frac{273}{(273 + t)} \qquad (3)$$

3. *Dispozitivele de reținere*

Toxicii sub formă de *gaze și vapori* sînt reținuți în *medii absorbante lichide* aflate în absorbitoare.

Absorbitoarele (barbotoarele, vasele spălătoare) sînt recipiente astfel construite, încît la trecerea aerului prin lichidul absorbant, să se realizeze o barbotare lentă, permițînd un contact prelungit între aer și lichid, cu cedarea toxicului. Totodată, nu trebuie să se aspire lichidul în exterior.

În raport cu capacitatea, absorbitoarele sînt: microabsorbitoare, cînd concentrațiile mici de toxic sînt acumulate prin trecerea unui volum mare de aer printr-un volum mic de lichid (1—5 ml); macroabsorbitoare, cînd concentrațiile mari de toxic sînt reținute în volume mari de lichid (50—100 ml); absorbitoare normale, cînd concentrațiile medii de toxic sînt reținute în cantități medii de lichid (10—30 ml).

De asemenea, în raport cu construcția, absorbitoarele sînt de tipuri diferite, însă este obligatorie pătrunderea aerului în recipient printr-un sistem care să permită dispersarea sa: un tub cu extremitatea efilată, cu bulă și orificii, cu placă poroasă etc. (fig. 9 a, b, c, d, e, f).

Un tip aparte este *impingerul* (macro- și micro) (fig. 10) prin care aerul pătrunde în jet puternic și izbindu-se de fundul recipientului, se divizează, favorizînd reținerea toxicului.

Mediul absorbant lichid reține toxicul prin dizolvare sau/și prin reacții chimice. În ultimul caz reprezentînd absorbția propriu-zisă, se utilizează, de obicei, soluții de electroliți, în care toxicul este fixat ca soluție sau precipitat. Dacă se utilizează absorbanți oxidoreducători, se dozează, în final, compusul eliberat sau consumat (de exemplu, iodul, eliberat de clor sau brom, sau consumat de dioxid de sulf) sau excesul de absorbant (de exemplu, arsenitul, din acțiunea clorului).

Toxicii sub formă de *aerosoli și pulberi* sînt reținuți în *medii absorbante solide*, aflate pe diferite suporturi ca de hîrtie de filtru, membrană din material plastic, vată hidrofilă, vată de sticlă etc.

Scanned with OKEN Scanner

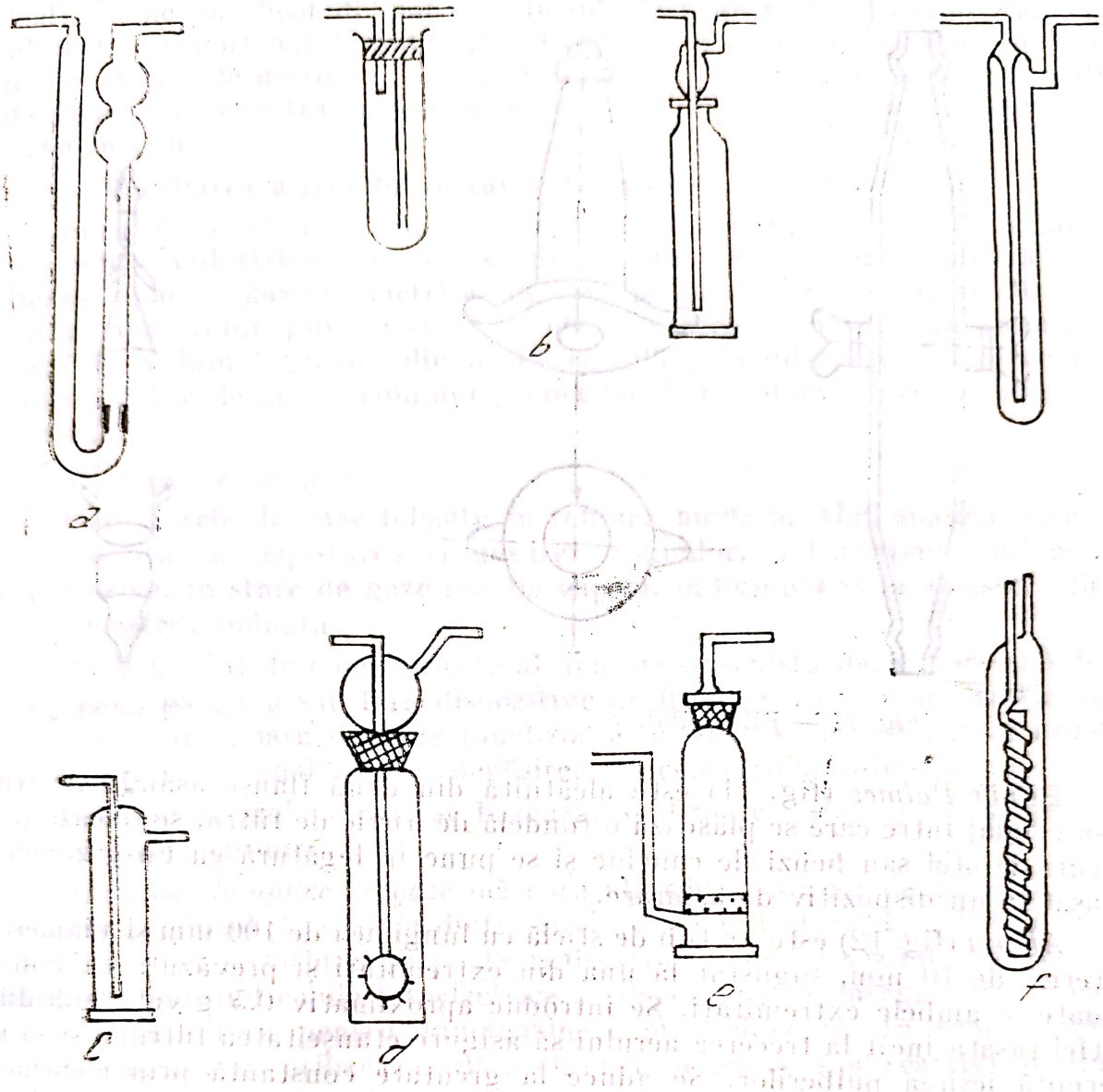


Fig. 9 — Diferite tipuri de absorbitoare.

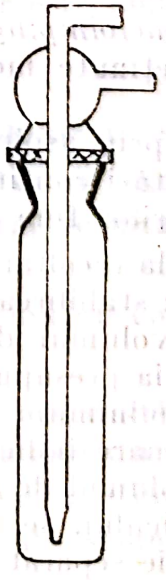


Fig. 10 — Macroimpinger.

Scanned with OKEN Scanner

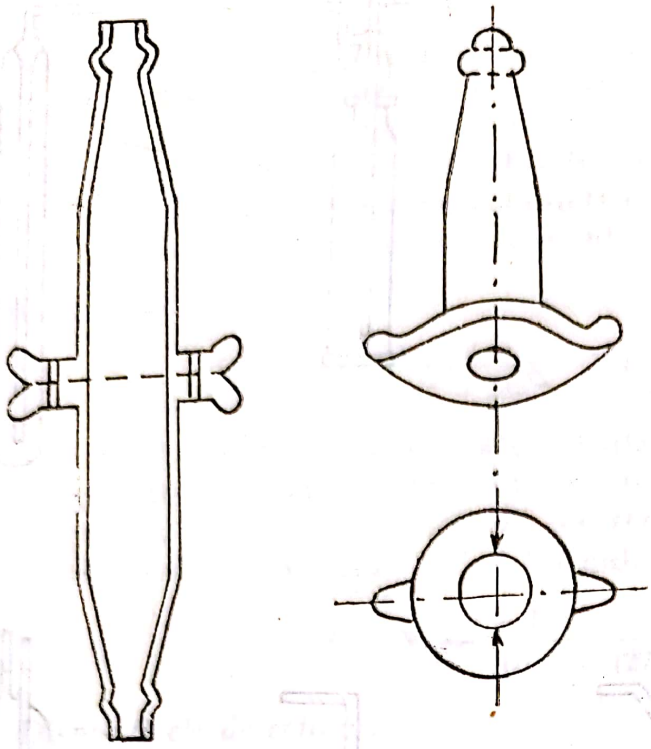


Fig. 11 — Pîlnie Palmer.

Fig. 12 — Alonjă.

Pîlnia Palmer (fig. 11) este alcătuită din două flanșe asamblate printr-un rodaj între care se plasează o rondelă de hîrtie de filtru, se fixează prin arcuri de oțel sau benzi de cauciuc și se pune în legătură cu un gazometru atașat la un dispozitiv de aspirare.

Alonja (fig. 12) este un tub de sticlă cu lungimea de 100 mm și diametrul interior de 10 mm, îngustat la una din extremități și prevăzută cu dopuri rodate la ambele extremități. Se introduc aproximativ 0,5 g vată hidrofilă, astfel tasată încît la trecerea aerului să asigure etanșeitatea filtrului și să nu permită ieșirea pulberilor. Se aduce la greutate constantă prin menținere la 105°C la etuvă, se păstrează în exsicator pînă la întrebuințare, iar la locul de recoltare se fixează în poziție orizontală și se pune în legătură cu un gazometru și un aspirator.

Macro- și microimpingerele funcționează pe principiul impactului, încît pulberile sînt reținute mecanic prin izbirea aerului în jet de fundul recipientului.

Recoltarea prin aspirare a pulberilor are următoarele avantaje: realizarea unei recoltări continue; concentrarea pulberilor; includerea, în recoltare, și a pulberilor fine care scapă altor metode de recoltare.

În general, la recoltarea prin aspirare, trebuie să se țină seama de următoarele condiții: stabilirea locului și momentului recoltării (să fie cît mai reprezentative); volumul de aer recoltat depinde de sensibilitatea metodei și de concentrația presupusă a toxicului (trebuie însă să se poată determina o cantitate de minimum jumătate din concentrația maximă admisă; dacă testările preliminare indică o concentrație mult deasupra concentrației maxime admise, volumul de aer recoltat se reduce); pentru asigurarea reținerii complete a toxicului, se montează în serie 2—3 absorbitoare, iar determinarea se face, fie separat pentru fiecare absorbitor (rezultatele se adună în

final), fie pe un alicot din întregul lichid, deci din toate absorbitoarele (rezultatul se raportează la cantitatea totală de lichid); se prevede, în afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, încă un absorbitor cu soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin el, constituind proba martor.

C. **Recoltarea direct în aparatul de analiză**

În cazul dozării unor concentrații mari de gaze din aer — oxid de carbon în condiții industriale, oxigen și dioxid de carbon din atmosferă — se folosesc aparate gaz-volumetrice, în care proba de aer se aspiră direct în biureta aparatului, punîndu-se în contact, succesiv, cu soluțiile absorbante specifice. Volumul gazului din probă se află prin diferența dintre volumul probei inițiale de aer și volumul probei după introducerea sa în soluția absorbantă.

Analizoarele de gaze

Analizoarele de gaze folosite în tehnica modernă sînt aparate care asigură recoltarea, depistarea și dozarea toxicilor, substanțelor inflamabile și explozive, în stare de gaze sau de vapori, individual și în amestec, direct din atmosfera poluată.

După gradul de complexitate al aparatelor, există detectoare simple de gaze, analizoare (cu sau fără dispozitive de înregistrare a concentrației toxicilor), semnalizatoare de gaze (analizoare prevăzute cu dispozitive acustice sau optice de semnalizare la depășirea concentrațiilor admisibile).

După principiul pe care se bazează, analizoarele sînt: optice, termochimice și electrochimice.

Analizoarele optice de gaze măsoară absorbția luminii de către toxic sau de către produsul de reacție dintre toxic și mediul absorbant, lichid sau solid. Măsurarea absorbției se poate realiza în domeniul vizibil, ultraviolet și infraroșu, folosind celule fotoelectrice și dispozitive de înregistrare, eventual cu teletransmitere pentru înmagazinare și prelucrare. În scopul evitării interferențelor, se utilizează filtre chimice selective sau reactivi suplimentari pentru descompunerea sau mascarea substanțelor interferente. Se determină un singur toxic sau un amestec, în acest ultim caz fiind, uneori, necesară separarea componenților prin microdistilare, microdifuzie, cromatografie, electroforeză. Sensibilitatea determinărilor este mărită prin utilizarea fluorimetriei în locul colorimetriei.

Astfel de analizoare sînt:

— analizorul fotocolorimetric pentru oxid de azot: se oxidează NO la NO_2 cu amestec de aer și ozon, se descompune termic excesul de oxidant și se măsoară fotometric culoarea produsului colorat rezultat din reacția NO_2 cu benzidină în acid acetic;

— analizorul înregistrator pentru H_2S: toxicul colorează o peliculă sensibilă impregnată cu acetat de plumb;

— semnalizatorul automat pentru concentrațiile periculoase de HCN: aerul se aspiră continuu printr-o soluție de iod amidonată și se măsoară fotometric modificarea culorii soluției absorbante, iar la atingerea concentrației periculoase de HCN se conectează dispozitivul de semnalizare;

Scanned with OKEN Scanner

— analizorul pentru CO : se bazează pe absorbția selectivă a radiațiilor infraroșii de către toxic ;

— analizorul pentru determinarea concomitentă a H_3As, H_2S, Cl_2 O_3, vaporilor de mercur : se măsoară fotometric colorația unor benzi care se deplasează continuu, impregnate în soluții adecvate, iar la depășirea limitelor admisibile, se emit semnale optice și la avarii, semnale acustice.

Analizoarele termochimice de gaze măsoară energia calorică rezultată din reacțiile chimice ale toxicilor.

Astfel de analizoare sînt :

— analizorul pentru oxid de carbon : se măsoară efectul termic rezultat din oxidarea, sub acțiunea catalitică a hopcalitei, a CO și CO_2, iar la depășirea concentrației admisibile, se emite un semnal acustic ;

— analizorul pentru metan cu citire la distanță : se măsoară efectul termic produs la arderea catalitică a metanului pe un filament de platină. Înregistrarea poate fi făcută la 5 km de amplasarea receptorului analizorului ;

— analizorul pentru concentrațiile explozive de vapori de benzină : se măsoară efectul termic rezultat din arderea vaporilor de benzină pe un filament de platină, iar substanțele interferente din aer sînt reținute într-un cartuș filtrant.

Analizoarele electrochimice de gaze : se măsoară variația conductivității electrice a soluției absorbante, după reținerea toxicului din amestecul gazos.

Astfel de analizoare sînt :

— analizorul pentru SO_2 : se oxidează SO_2 cu H_2O_2 pînă la H_2SO_4 și se determină variația conductivității electrice a soluției de reactivi ;

— analizorul pentru CO, CO_2, HCl, SO_2, vapori de benzină : la absorbția fiecărui component din amestec, se produce o variație a conductivității soluției absorbante.

Utilizarea analizoarelor de gaze reprezintă o soluție ideală pentru supravegherea continuă a atmosferei poluate, permițînd semnalarea depășirii concentrațiilor maxime admisibile, ca și a scăpărilor de gaze și a avariilor.

Exprimarea concentrației toxicilor din aer

Toxicii din aer se exprimă în :

Greutate/volum (g/v), cînd toxicul se exprimă în unități de greutate iar aerul în unități de volum ; de exemplu, mg/litru.

Volum/volum (v/v), cînd atît toxicul, cît și aerul, se exprimă în unități de volum, și anume :

— procente de volum (% vol.), pentru concentrații peste 0,1% ;

— părți pe milion (ppm), pentru concentrații cuprinse între 0,1 ppm și 100 ppm ; reprezintă 1 volum de toxic la 1 milion de volume de aer ;

— părți pe bilion (ppb), pentru concentrații sub 0,1 ppm ; reprezintă 1 volum de toxic la 1 bilion de volume de aer.

Transformarea acestor modalități diferite de exprimare nu se face totdeauna direct.

Scanned with OKEN Scanner

Transformarea ppm sau ppb în % volum și invers se face direct, echivalența la presiunea de 760 mm Hg fiind :

$$1 \text{ ppm} = 1\,000 \text{ ppb} = 0{,}1\% \text{ vol.}$$

De exemplu, pentru CO :

$$1\,200 \text{ ppm CO} = 1\,200\,000 \text{ ppb CO} = 0{,}12\% \text{ vol.CO}$$

Transformarea mg/litru în ppm și invers necesită, fie formule de convertire, fie tabele de convertire.

Formule de convertire

Se știe că o moleculă-gram dintr-o substanță gazoasă sau adusă în stare de vapori ocupă un volum de 22,41 litri, la presiunea de 760 mm Hg și temperatura de 0°C.

Se aplică relația Clapayron :

$$P.V. = \frac{m.R.T.}{M} \quad \text{sau} \quad V = \frac{m.R.T.}{M.P.} \tag{1}$$

în care :

V = volumul toxicului, în ppm ;
m = concentrația toxicului, în mg/litru ;
T = temperatura absolută = 273 + t°C ;
P = presiunea atmosferică, în mm Hg ;
M = masa moleculară a toxicului, la 0° și 760 mm Hg ;

$$R = \frac{V_0 \cdot P_0}{273} = \frac{22{,}41 \cdot 760}{273} = 62{,}36 = \text{constantă}$$

Din relația (1) se calculează concentrația în ppm dacă se cunoaște concentrația în mg/litru :

$$\text{ppm} = \frac{62{,}36 \cdot T}{M \cdot P} \text{ mg/litru} \tag{2}$$

și, invers, se calculează concentrația în mg/litru dacă se cunoaște concentrația în ppm :

$$\text{mg/litru} = \frac{P.M.}{62{,}36} \text{ mg/litru} \tag{3}$$

De exemplu, pentru CO : se transformă concentrația de 2 mg/litru în ppm, la P = 760, t = 25°C (M = 28) :

$$\text{ppm} = \frac{62{,}36(273 + 25)}{28 \cdot 760} \cdot 2 = 1\,746$$

și invers, se transformă concentrația de 1 746 ppm în mg/litru, în aceleași condiții de presiune și temperatură :

$$\text{mg/litru} = \frac{28 \cdot 760}{62{,}36(273 + 25)} \cdot 1\,746 = 2$$

Considerînd că în condițiile obișnuite de muncă, temperatura și presiunea nu variază considerabil față de 25°C și 760 mm Hg, la care volumul molecular este de 24,45 litri, relațiile (2) și (3) devin :

$$\text{ppm} = \frac{1\,000 \cdot 24{,}45}{M} \cdot \text{mg/litru} \qquad (4)$$

$$\text{mg/litru} = \frac{M}{1\,000 \cdot 24{,}45} \cdot \text{ppm} \qquad (5)$$

De exemplu, pentru CO : pentru 2 mg/litru, la 25°C și 760 mm Hg, corespund :

$$\text{ppm CO} = \frac{1\,000 \cdot 24{,}45}{28} \cdot 2 = 1\,746$$

iar pentru 1 746 ppm CO, în aceleași condiții, corespund :

$$\text{mg CO/litru} = \frac{28}{1\,000 \cdot 24{,}45} \cdot 1\,746 = 2$$

b. *Tabele de convertire*

Pentru simplificarea acestor calcule s-a alcătuit un tabel pe trei coloane *(anexa 1)* conținînd : în prima coloană masele moleculare de la 1 la 300 ; în a doua, valorile corespunzătoare unui mg/litru, în ppm ; în a treia, valorile corespunzătoare unui ppm în mg/l.

De exemplu, pentru CO la masa moleculară 28 corespund, la 1 mg CO/litru, 873 ppm, deci la 2 mg/litru, 1 746 ppm. Invers, la 1 ppm corespund 0,001145 mg CO/litru, deci la 1 746 ppm corespund 1 746 · 0,001145 = 2 mg CO/litru.

3. *Transformarea mg/litru în % volum și invers* se realizează cu ajutorul formulelor :

$$1\,\%\ \text{volum} = \frac{M \cdot P.}{6{,}236 \cdot T}\ \text{mg/litru} \qquad (6)$$

$$1\ \text{mg/litru} = \frac{6{,}236 \cdot T}{M.P.}\ \%\ \text{vol.} \qquad (7)$$

De exemplu, pentru CO se transformă concentrația de 2 mg/litru la P = 760 mm Hg și t = 25°C, în procente de volum :

$$1\ \text{mg CO/litru} = \frac{6{,}236(273 + 25)}{28 \cdot 760}\ \%\ \text{vol.} = 0{,}087\ \%\ \text{vol.}$$

$$2\ \text{mg CO/litru} = 2 \cdot 0{,}087 = 0{,}174\ \%\ \text{vol.}$$

I.2. IZOLAREA TOXICILOR DIN PRODUSE BIOLOGICE ȘI ALTE PRODUSE

Toxicii, inclusiv medicamentele, pot fi izolați din proba de analizat (urină, sînge, lichide gastrice, organe, alte produse biologice, corpuri delicte, alimente, băuturi, produse industriale, ape industriale etc.) prin diferite metode, principalele fiind incluse în *tabelul nr. 1.*

Tabelul 1

Principalele metode de izolare a toxicilor din produse biologice și alte produse

Metoda de izolare	*Categoria de toxici*
Distilare	Toxici volatili
Antrenare cu vapori de apă	Toxici volatili
Antrenare cu un curent de aer	Toxici gazoși (H_2S, H_3P etc.) Toxici volatili (CS_2, HCN, C_6H_6)
Difuzie simplă	Toxici volatili (etanolul)
Macerare cu apă	Toxici minerali (unele săruri)
Dializă	Toxici minerali (acizi, baze, săruri alcaline și alcalinoteroase)
Electrodializă	Toxici minerali (fluoruri) Toxici organici nevolatili (barbiturici, unii alcaloizi etc.)
Mineralizare	Toxici minerali (metale și compușii lor)
Extragere cu solvenți	Toxici organici nevolatili

Dintre variantele posibile, se selectează metoda optimă de izolare în funcție de următorii factori :

Scopul analizei : identificarea sau stabilirea concentrației toxicului (doză letală, doză toxică, doză terapeutică, concentrație normală) ; precizarea formei toxicului (ca atare, metaboliți, forme conjugate sau legate de proteine) ; identificarea toxicului însuși sau numai a grupei căreia îi aparține (de exemplu, fenobarbitalul sau derivați barbiturici în general) ; limitarea ariei de cercetare la o anumită grupă (de exemplu, numai metale) sau, dimpotrivă, extinderea la majoritatea grupelor de toxici ; urgența analizei ; scopul în care se solicită rezultatul etc.

Materialul de analizat disponibil : în cantitate mare sau mică ; simplu (apa) sau complex (organe) ; numărul probelor de analizat din acel material etc.

Natura toxicului : necunoscută sau indicată (individual sau ca grupă de toxic) în actul de solicitare a analizei (în cazul unei indicații, mersul analizei depinde de existența unor metode deja stabilite sau de necesitatea elaborării unor tehnici noi de izolare) ; toxicul se găsește singur sau în amestec cu alți toxici etc.

Eventualele substanțe interferente : antidoturi, medicamente sau alte substanțe administrate în scop diagnostic etc.

Disponibilitățile laboratorului : aparatura, capacitatea de lucru, personalul etc.

Scanned with OKEN Scanner

I.2.1. IZOLAREA TOXICILOR VOLATILI

Toxicii volatili sînt izolați prin :

— distilare, cînd toxicul are punctul de fierbere sub 100°C ;

— antrenare cu vapori de apă, cînd punctul de fierbere este superior punctului de fierbere al apei, sau cînd produsul se descompune la temperatura sa de fierbere ;

— antrenare cu un curent de aer, în cazul special al unor toxici gazoși și volatili ;

— difuzie simplă, cînd toxicul este ușor volatil.

A. Distilarea

Se folosesc instalații adaptate pentru micro- sau macrodistilare, în raport cu cantitatea de produs de analizat (fig. 13 a, b).

Balonul de distilare prevăzut cu un termometru este atașat la un refrigerent descendent terminat cu o alonjă, al cărei capăt este introdus în recipientul de colectare (preferabil un balon cotat) conținînd cîțiva ml de apă sau alt lichid adecvat.

În cazul toxicilor foarte volatili, recipientul de colectare este menținut într-un vas cu gheață. Încălzirea se face direct pe sită sau pe baie electrică, sau (pentru a evita descompunerea prin piroliză a produsului, precum și apariția unor compuși neoformați de exemplu, HCN rezultați din descompunerea substanței organice) într-o baie de clorură de calciu 40%. Dacă toxicul este ușor degradat la căldură, se preferă distilare sub presiune scăzută. Eventuala fosforescență a distilatului este sesizată prin acoperirea refrigerentului cu o carcasă de culoare neagră, prevăzută cu un orificiu de observare. Spumarea este împiedicată prin adaos, în balonul de distilare, de parafină solidă, ulei de parafină sau silicon (nu se utilizează alcoolul octilic).

Cînd toxicul este necunoscut — în cazul unei analize generale — sînt necesare două distilări : la prima distilare, în mediu acid, se separă toxicii acizi și neutri, iar la a doua, în mediu alcalin, toxicii alcalini.

Distilarea în mediu acid. Produsul solid analizat (10—50—200 g) este mărunțit și omogenizat prin mijloace adecvate și tratat cu o cantitate dublă de apă distilată. Se acidulează cu acid sulfuric, azotic sau tartric și se supune distilării. Se culege, în apă distilată sau un lichid slab alcalin, o cantitate de distilat aproape egală cu volumul de apă adăugat. Se completează distilatul

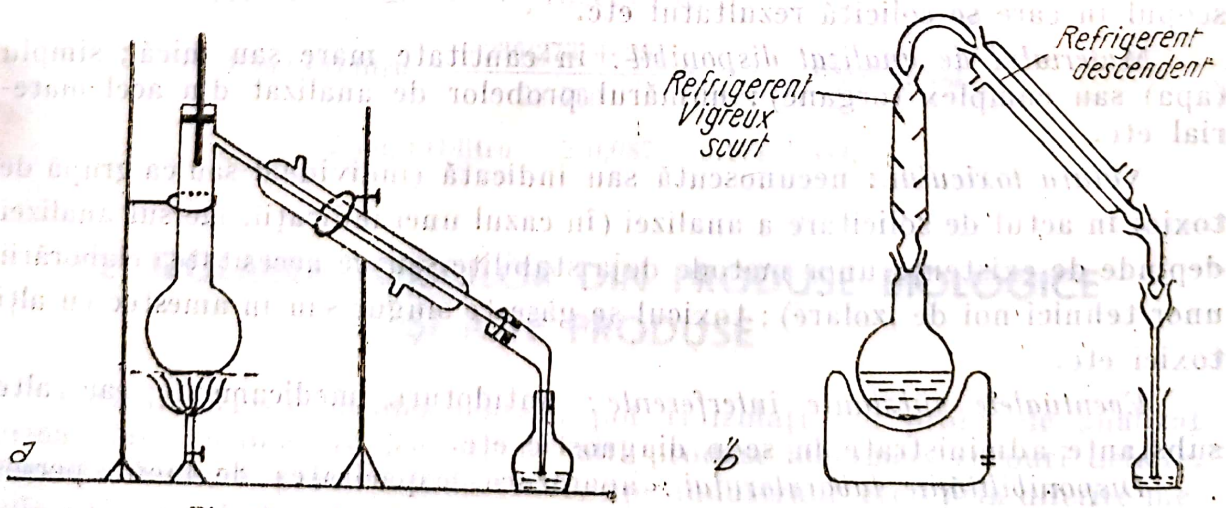


Fig. 13, a, b — Instalații pentru distilarea toxicilor volatili.

la un volum cunoscut. Dacă volumul distilatului este mare (de exemplu 200 ml) se redistilă de două ori succesiv, culegîndu-se de fiecare dată numai 1/2 din volumul supus distilării, încît, în final, volumul distilatului va fi, în acest caz, de 50 ml.

Produsul lichid de analizat se distilă ca atare după ce, în prealabil, a fost acidulat.

Distilarea în mediu alcalin. Reziduul din balon, după separarea toxicilor acizi și neutri, este alcalinizat cu MgO solid sau Na_2CO_3 10%. Se adaugă o cantitate dublă de apă față de produsul inițial luat în lucru și se distilă. Pentru a evita pierderile bazelor organice ușor volatile, distilatul este cules în H_2SO_4 0,1 N.

Cînd toxicul este cunoscut se execută distilarea în mediu acid sau alcalin în funcție de natura toxicului. Se oprește distilarea atunci cînd reacția de recunoaștere a toxicului este negativă. Dacă volumul distilatului este prea mare se concentrează, ca mai sus, apoi se aduce la un volum cunoscut.

Toxicul din distilat este identificat și dozat, fie în distilatul ca atare fie în reziduul rezultat din evaporarea unui solvent cu care a fost epuizat distilatul. Evaporarea solventului se realizează pe baie de apă (cînd toxicul este termostabil sau are volatilitate redusă) sau în vid (cînd toxicul este termolabil sau foarte volatil).

B. Antrenarea cu vapori de apă

Se bazează pe principiul conform căruia un amestec de două substanțe volatile emit vapori în cantități direct proporționale cu tensiunea de vapori proprie fiecărei substanțe. Prin încălzire tensiunea de vapori a fiecărei substanțe crește, independent de cealaltă. Cînd tensiunea de vapori a amestecului egalează presiunea atmosferică, amestecul începe să fiarbă și substanțele distilă. Deoarece suma tensiunilor de vapori a componentelor amestecului este egală cu presiunea atmosferică, fiecare component distilă la o temperatură inferioară față de propria sa temperatură de fierbere. Pe baza acestui principiu, antrenarea cu vapori de apă este obligatorie pentru izolarea :

— substanțelor cu puncte de fierbere ridicate (peste 100°C) ;

— substanțelor nestabile la punctul de fierbere (de exemplu, plumbtetraetilul).

Substanțele antrenabile cu vapori de apă se divid în :

— substanțe insolubile în apă, a căror tensiune de vapori nu este influențată de prezența apei (de exemplu, hidrocarburi) ;

— substanțe solubile în apă, a căror tensiune de vapori este micșorată de prezența apei (de exemplu, acizi, alcooli, fenoli, amine).

La antrenarea substanțelor insolubile în apă, tensiunea de vapori este direct proporțională cu concentrația și invers proporțională cu masa moleculară, conform relației :

$$\frac{P_1}{P_2} = \frac{C_1 \cdot M_2}{C_2 \cdot M_1}$$

în care :

P_1 și P_2 = tensiunea de vapori a substanței organice și a apei în fază de vapori ;

C_1 și C_2 = concentrația substanței organice și a apei în fază de vapori ;

M_1 și M_2 = masa moleculară a substanței organice și a apei.

Scanned with OKEN Scanner

La antrenarea substanțelor solubile în apă intervin și alți factori, ceea ce exclude aplicarea relației de mai sus.

Micșorarea tensiunii de vapori — respectiv scăderea antrenabilității — se datorează :

— prezenței grupărilor polare hidrofile care formează cu apa hidrați și asocieri intermoleculare ;

— prezenței a mai multor grupări polare (astfel, paranitrofenolul este de 388 de ori mai puțin antrenabil decît fenolul, datorită adaosului grupării NO_2).

Mărirea tensiunii de vapori — respectiv creșterea antrenabilității — depinde de :

— creșterea masei moleculare în seriile omoloage, în general alungirea lanțului alifatic, cu micșorarea polarității ;

— prezența grupărilor disubstituite în poziția orto ; izomerii orto, spre deosebire de izomerii meta și para, își neutralizează polaritatea celor doi substituenți prin legături de hidrogen, formînd complecși interni, cu reducerea capacității de hidratare ;

— adăugarea de săruri minerale neutre sau inerte, care ridică punctul de fierbere al amestecului, mărind cantitatea substanței de antrenat în faza de vapori ; de asemenea, sarea neutră scade gradul de hidratare a grupărilor polare din compusul de antrenat ;

— utilizarea vaporilor supraîncălziți, dacă substanțele sînt termostabile, tensioactive și cu puncte de fierbere ridicate.

Antrenarea cu vapori este perturbată în cazul formării de amestecuri azeotrope, adică a amestecurilor de concentrație fixă, cu punct de fierbere mai scăzut decît punctele de fierbere ale fiecărui component în parte (*tabelul nr. 2*).

Tabelul 2

Unele amestecuri azeotrope (după Stepanov)

Substanțe care dau amestecuri azeotrope cu apa	*Punctul de fierbere* (°C)		*Procent de apă în amestecul azeotrop*
	al substanței	*al amestecului azeotrop*	
Alcoolul etilic	78,3	78,15	4,43
Alcoolul izoamilic	131,0	95,15	49,6
Benzenul	80,2	69,25	8,83
Cloroformul	61,2	56,1	2,5
Tetraclorura de carbon	76,75	66,0	4,1
Fenolul	182,0	99,6	90,8
Anilina	184,25	75,0	81,8
Sulfura de carbon	46,25	42,6	3,0

Scanned with OKEN Scanner

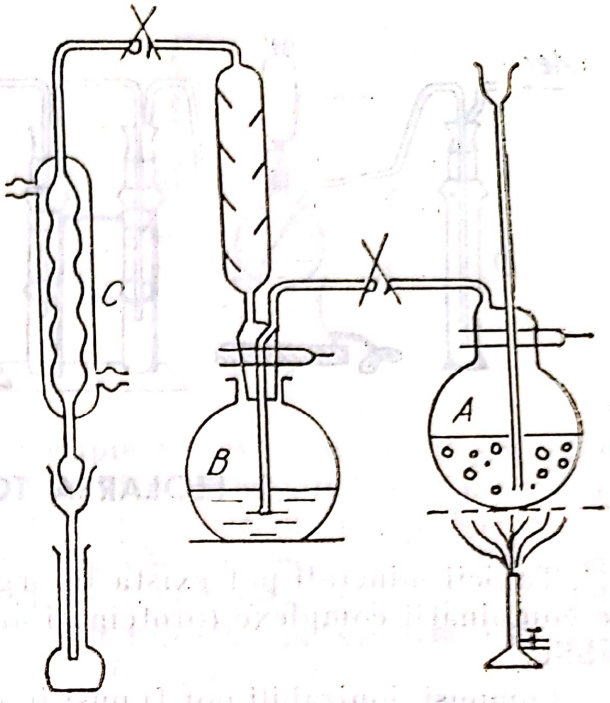


Fig. 14 — Instalație pentru antrenare de vapori de apă a toxicilor volatili.

Pentru antrenarea cu vapori de apă se folosesc instalații diferite; un model este prezentat în fig. 14.

Produsul de analizat omogenizat este introdus în balonul de antrenare (B) și tratat cu un volum egal de apă, apoi acidulat. După conectarea balonului la generatorul de vapori (A) și la refrigerent (C), produsul se supune antrenării pînă cînd condensul nu mai dă reacție pozitivă pentru toxicul volatil acid cercetat (dacă acesta este cunoscut). După răcire, reziduul rămas în balonul de distilare este alcalinizat și supus unei noi antrenări pentru izolarea toxicilor volatili alcalini, care sînt colectați în H_2SO_4 0,1 N. Condensul, adus la un volum cunoscut, este prelucrat ca și distilatul.

C. **Antrenarea cu un curent de aer**

Unii toxici volatili (benzenul, HCN din sînge, hidrocarburile aromatice din organe, CS_2 din cereale etc.) pot fi separați prin antrenare cu un curent de aer.

Instalația se compune din: recipientul cu produsul de analizat (A); absorbitorul cu reactivul specific toxicului de cercetat (B); dispozitivul de aspirare (de exemplu, pompă de vid) pus în legătură cu absorbitorul; dispozitivul de purificare a aerului (C) (dacă este cazul), montat înaintea recipientului cu produsul de analizat (fig. 15).

Unii toxici gazoși solubili în sînge și eliminați ca atare pe cale respiratorie (H_2S, H_3P) pot fi, de asemenea, extrași din sînge prin antrenare cu un curent de aer, utilizîndu-se o instalație adecvată.

D. **Difuzia simplă**

(v. Acetona — dozare din sînge și urină)

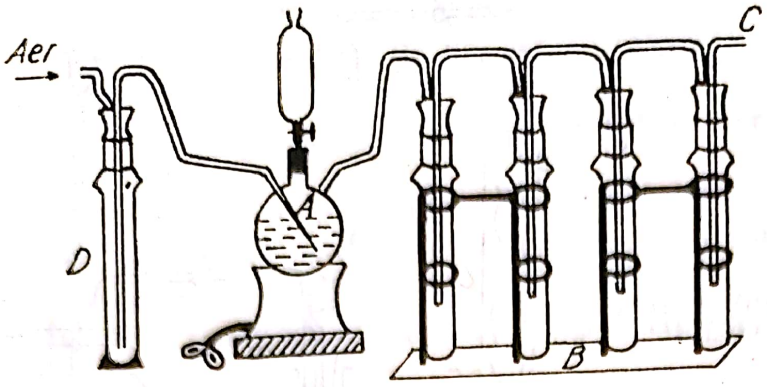


Fig. 15 — Instalație pentru antrenare cu un curent de aer a toxicilor volatili.

I.2.2. IZOLAREA TOXICILOR MINERALI

Toxicii minerali pot exista în organism sub formă ionică sau sub formă de combinații complexe (proteinați ai metalelor grele), puțin sau deloc ionizabile.

Compușii ionizabili pot fi puși în evidență în maceratul apos al produsului de analizat, pe cînd combinațiile proteice ale metalelor grele, neionizabile, nu pot fi depistate direct. În acest caz se impune mineralizarea — distrugerea substanței organice — pentru a elimina acțiunea perturbatoare a substanței proteice și a ioniza din nou toxicul mineral.

În consecință, toxicii minerali sînt izolați din produsele organice prin : dializă, electrodializă, mineralizare.

Dializa

Toxicii minerali disociabili (acizi, baze, săruri) din resturi alimentare, vomă, conținut stomacal, mai rar țesuturi (în care o parte din toxic se găsește sub formă legată ca proteinați) se izolează prin macerare cu apă a produsului, apoi filtrare sau supunere la dializă.

Modul de lucru : dializorul este un tub de sticlă cu diametrul de 3—4 cm. Prin una dintre extemități, liberă, se introduce maceratul sau filtratul. Cealaltă extremitate, acoperită cu o membrană semipermeabilă, este introdusă într-un cristalizor cu apă distilată, în care toxicul difuzează treptat. Dializatul, concentrat (dacă este posibil) prin evaporare, este adus la un volum cunoscut pentru dozare sau servește ca atare pentru identificarea toxicului.

Electrodializa

Unii toxici disociabili, minerali (de exemplu, fluorurile) sau organici nevolatili (de exemplu, alcaloizi, derivați barbiturici) se pot izola din produse biologice prin electrodializă.

Electrodializa se bazează pe migrarea toxicilor spre anod sau catod, pe baza polarității, din produsul biologic plasat între două membrane semipermeabile, în recipiente cu apă distilată. Trecerea curentului electric facilitează eliberarea toxicului din combinația proteică în care se află.

Modul de lucru : Electrodializorul se compune din trei recipiente separate prin membrane semipermeabile (celofan rezistent), M. În recipientul B, central, se plasează produsul de analizat (de exemplu, organe) fin divizat și triturat cu apă distilată pentru a forma o pastă semifluidă și adus la pH-ul

Scanned with OKEN Scanner

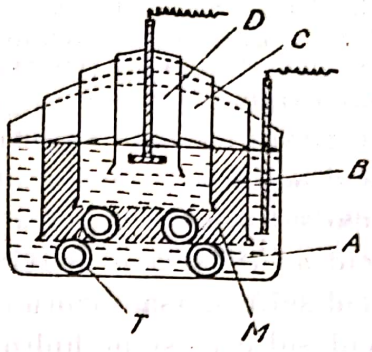


Fig. 16 — Electrodislizor.

optim de disociere a toxicului respectiv. Recipientele A (anodic) și C (catodic) conțin apă distilată și electrozii corespuzători. Un sistem din tuburi din sticlă goale, T, în care circulă apa, asigură răcirea masei încălzite prin trecerea curentului electric și totodată formează suporturi pentru menținerea distanței potrivite între recipiente. Un miliampermetru indică intensitatea curentului (inițial cîțiva miliampermetri, crescînd treptat pînă la aproximativ 150 miliampermetri și scăzînd la sfîrșitul operației) (fig. 16).

Dacă materialul de analizat conține toxici organici (alcaloizi, derivați barbiturici), aceștia, din cauza disocierii la pH-ul corespunzător (de exemplu, pentru derivații barbiturici se aduce pH-ul la 9,2 cu dietilamină) se orientează spre unul din poli. Eliberarea din combinația organică fiind favorizată de trecerea curentului electric și masa moleculară fiind mult mai mică decît a proteinelor, toxicul traversează selectiv membrana semipermeabilă, acumulîndu-se în recipientul anodic (derivați barbiturici) sau catodic (alcaloizi). Lichidele din recipiente sînt apoi extrase cu un solvent adecvat.

Dacă materialul de analizat conține toxici minerali, aceștia disociază și traversează membrana, concentrîndu-se în recipientul corespunzător. Deoarece ionii minerali dau naștere, în lichidele anodice sau catodice, în contact cu electrozii, la reacții secundare (oxidări, reduceri etc.), se plasează electrodul respectiv într-un al patrulea recipient, D, de protecție. În acest mod, majoritatea produsului dializat este sustras reacțiilor secundare.

Electrodializa prezintă avantajul izolării cantitative și a obținerii toxicului în stare pură. Operația durează 24—48 ore.

Mineralizarea

Mineralizarea se realizează pe cale uscată (calcinare) sau umedă. Principalele metode de mineralizare sînt următoarele:

a) *Mineralizare pe cale uscată (calcinare)*

— Calcinare simplă (directă)

— Calcinare cu adaos de oxidanți

- Azotat de potasiu (tehnica Orfila)
- Oxid de magneziu (tehnica Géneuil)
- Carbonat de sodiu și azotat de potasiu
- Oxid de magneziu și azotat de magneziu (tehnica Monthulé, Kohn-Abrest)

— Calcinare în curent de oxigen

Scanned with OKEN Scanner

b) *Mineralizare pe cale umedă*

— Mineralizare cu clor (clorat de potasiu și acid clorhidric — tehnica Fresenius-Babo-Ogier-Stepanov)

— Mineralizare cu acid sulfuric, acid azotic, alte adaosuri

- Acid sulfuric și acid azotic (tehnica sulfonitrică Dénigès)
- Acid sulfuric, acid azotic și acid percloric (tehnica Kahane)
- Acid azotic și acid percloric
- Acid sulfuric (sau azotic) și permanganat de K
- Acid sulfuric și perhidrol
- Alte metode de mineralizare

Condițiile obligatorii pentru o mineralizare satisfăcătoare sînt următoarele :

— obținerea unei mineralizări complete, cu eliberarea totală a toxicului din combinația organominerală ;

— eliminarea pierderii de toxic prin volatilizare (Hg, F), deflagrare, adsorbție etc. ;

— evitarea utilizării reactivilor în cantități mari pentru a nu dilua produsul de analizat, în care deja toxicul se găsește în cantități mici dispersat în masa mare de produs ;

— evitarea transformării toxicului în forme netoxice, care ar scăpa astfel analizei (de exemplu, trecerea fosforului și hipofosfitului în acid fosforic, component normal al organismului) ;

— folosirea reactivilor cu un grad de puritate corespunzător și a sticlăriei neutre, spre a împiedica introducerea, pe această cale, a elementelor cercetate (Pb, As etc.) ;

— evitarea unei tehnici laborioase sau costisitoare.

Calcinarea

Fiecare dintre variante are avantajele și dezavantajele sale.

Calcinarea simplă (directă) are avantajele obținerii unei cenuși fără reziduu organic, în care metalul se găsește, în majoritate, sub formă de carbonat și, de asemenea, a unei concentrări maxime a toxicului. Prezintă dezavantaje ca : operația este laborioasă și de lungă durată, necesitînd uscare prealabilă ; au loc pierderi de toxic, atît prin umflare și debordare, cît și prin volatilizarea metalelor (Zn, Cd), a oxizilor metalici (As), a unor săruri, în special cloruri (As, Sb) ; distrugerea este incompletă atunci cînd cărbunele este inclus în topitura carbonaților alcalini.

Pentru remedierea acestor inconveniente s-a recurs la diferite adaosuri.

Calcinarea cu adaos de oxidanți a fost inițiată de Orfila, care a folosit ca oxidant azotatul de potasiu. În acest mod faza reducătoare, în care compușii sînt reduși la metale (uneori volatile) este micșorată la maximum ; totuși rămîne pericolul pierderii de toxic prin deflagrare (deoarece cărbunele, împreună cu azotatul de potasiu formează un amestec exploziv). Ulterior, Géneuil a folosit, ca oxidant și alcalinizant, oxidul de magneziu care conferă porozitate masei de calcinat, facilitînd oxidarea cu oxigen atmosferic ; în plus,

Scanned with OKEN Scanner

se micșorează temperatura de combustie, minimalizînd pierderile, deoarece metalele oxiacide (As) ar trece în săruri volatile în absența oxidului de magneziu. Tehnica a fost ameliorată de Monthulé, apoi de Kohn Abrest, prin adăugare, la oxidul de magneziu, a azotatului de magneziu. Altă variantă a calcinării este cu adaos de amestec de carbonat de sodiu ți azotat de potasiu.

Calcinarea în curent de oxigen asigură o mineralizare mai rapidă, însă se pot produce pierderi de toxici prin volatilizare ; de aceea trebuie utilizată o aparatură specială pentru recuperarea produșilor minerali volatili.

Indiferent de variantă, calcinarea este exclusă pentru cercetarea mercurului.

Modul de lucru (tehnica Monthulé, Kohn Abrest). Se divizează fin 2 g produs de analizat și se triturează cu 4 g oxid de magneziu, apoi se adaugă, în porțiuni succesive, azotat de magneziu soluție 20%, pînă la obținerea unei mase omogene. Se trece masa într-un creuzet și se usucă la etuvă la 105—110°C, apoi în cuptorul de calcinare la 500—600°C. Se adaugă 2 ml acid sulfuric conc. și se încălzește pentru a îndepărta azotatul. Se dizolvă reziduul în HCl 10% și se filtrează. În soluție se determină toxicul.

Tehnica se aplică în special pentru arsen în concentrații mici în produsul biologic, cînd arsenul trece, datorită combustiei substanței organice, în arseniat de magneziu, nevolatil.

Mineralizarea cu clor (tehnica Fresenius-Babo-Ogier-Stepanov).

Mineralizarea cu clor a fost propusă încă din 1838 de Duflos și Millon și perfecționată de Fresenius și Babo (1844), Ogier (1891) și mai tîrziu de Stepanov.

Clorul, rezultat din acid clorhidric și clorat de potasiu, acționează asupra substanței organice, mineralizînd-o și permițînd trecerea metalelor sub formă ionică. Clorul reacționează cu apa, formînd acid hipocloros, care dă naștere la oxigen printr-o reacție al cărei echilibru este deplasat spre dreapta (în sensul formării oxigenului) în prezența substanței organice, acceptor de oxigen. Au loc reacțiile :

$$KClO_3 + 6\ HCl \rightarrow 3\ Cl_2 + KCl + 3\ H_2O$$

$$Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + HCl$$

$$2\ HOCl \rightarrow 2\ HCl + O_2$$

Modul de lucru. Varianta Ogier : produsul de analizat solid, fin divizat, sau lichid, concentrat prin evaporare, se introduce într-un balon Würtz. Întrucît clorul în prezența alcoolului etilic produce explozie, produsul de analizat care conține alcool trebuie, în prealabil, supus evaporării pentru îndepărtarea acestuia. În balonul Würtz se adaugă, peste produsul solid, acid clorhidric 12% în cantitate suficientă spre a obține o masă semifluidă. La produsul lichid se adaugă HCl concentrat, în cantitate calculată pentru ca în lichidul final concentrația acidului clorhidric să nu depășească 12%, evitîndu-se formarea (în cazul prezenței arsenului) de $AsCl_3$, volatilă. Se introduc apoi 2—3 g clorat de potasiu cristale și se adaptează la balon o pîlnie de separare, în care se găsește clorat de potasiu 5%. Se încălzește balonul pe baie de apă la 60—70°C. Tubul lateral al balonului este introdus într-un flacon conținînd NaOH 10% pentru captarea clorului în exces. Menținerea constantă

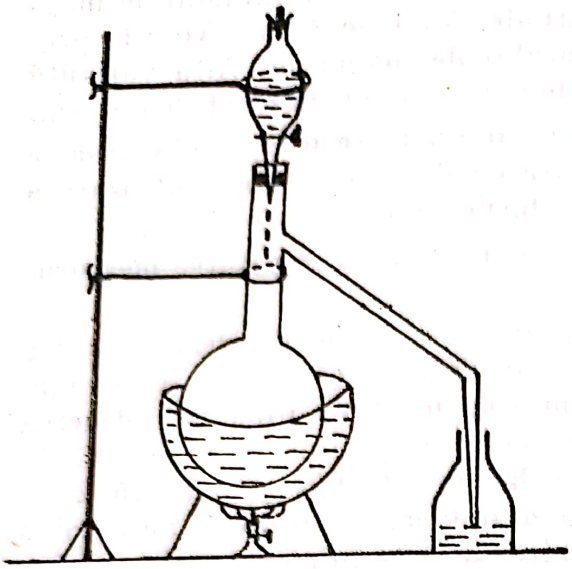


Fig. 17 — Instalație de mineralizare cu clor (varianta Ogier).

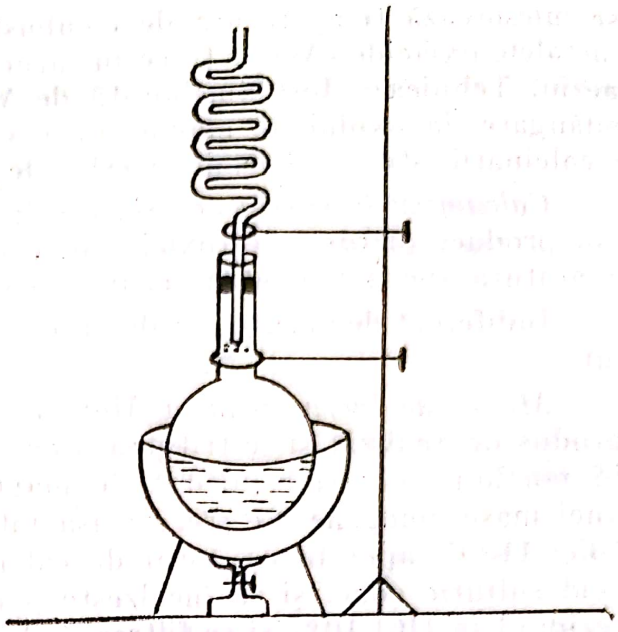


Fig. 18 — Instalație de mineralizare cu clor (varianta Stepanov).

a degajării clorului se realizează prin reglarea introducerii cloratului 5% prin robinetul pîlniei, agitînd periodic balonul (fig. 17).

b) *Varianta Stepanov* : mineralizarea are loc într-un balon închis cu un dop prin care trece un tub în spirală, servind de refrigerent. Peste produsul de analizat se introduce HCl — în cantitate astfel calculată încît în final concentrația să nu depășească 12% — și mici cantități de clorat de potasiu cristale, adăugate periodic, pînă la terminarea mineralizării. Se renunță deci la adaosul de soluție de clorat de potasiu (fig. 18).

În ambele variante, mineralizarea se consideră terminată cînd masa din balon devine un lichid floconos, galben-verzui.

Se diluează cu apă 1 : 1 și se concentrează pe baia de apă. Se tratează cu SO_2 sau $NaHSO_3$ pentru eliminarea urmelor de clor ; în plus, SO_2 reduce și compușii oxigenați superiori ai As^{5+}, trecîndu-i în As^{3+}, mai ușor de depistat.

Se răcește, cînd la suprafață apare un strat de grăsime, iar la fund se depune un sediment verzui format din : țesut conjunctiv nesolubilizat, o parte din grăsimi și totalitatea bariului sub formă de $BaSO_4$ (nu însă și clorurile insolubile de Pb și Ag și nici sulfații de Pb și Sr, căci mediul puternic acid asigură solubilizarea cantităților mici ale acestor săruri). Se filtrează prin hîrtie de filtru. Toxicii — în raport cu natura lor — se află fie dizolvați în lichidul de mineralizare, fie depuși în sediment sau incluși în stratul de grăsime, de unde trebuie extrași.

Filtratul, cu grăsimea și sedimentul, se mineralizează din nou, de obicei prin calcinare cu carbonat de sodiu și azotat de potasiu 1 : 2, cînd au loc reacțiile :

$$BaSO_4 \rightarrow BaCO_3$$

$$PbSO_4 \rightarrow BbCO_3 \rightarrow PbO + CO_2$$

$$2\ AgCl \rightarrow Ag_2CO_3 \rightarrow Ag_2O + CO_2$$

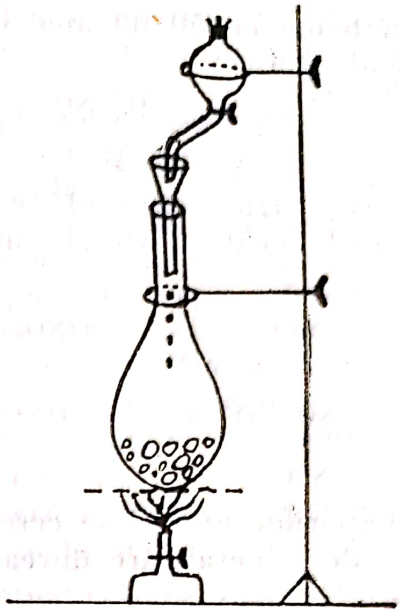


Fig. 19 — Instalație de mineralizare sulfonitrică.

Reziduul de la calcinare se reia cu puțină apă, care dizolvă sulfații alcalini și apoi cu acid azotic diluat, care dizolvă toți compușii rezultați din calcinare, trecîndu-i în ioni identificabili.

Lichidul de la mineralizarea inițială (filtratul) și lichidele de la prelucrarea depozitului de pe filtru, se supun analizei prin metodologia analitică clasică sau prin spectrofotometrie cu absorbție atomică etc.

Mineralizarea sulfonitrică (tehnica Dénigès)

Metoda se bazează pe acțiunea deshidratantă și oxidantă a amestecului de acid sulfuric concentrat și acid azotic concentrat. Au loc reacțiile :

$$H_2SO_4 \rightarrow SO_3 + H_2O$$

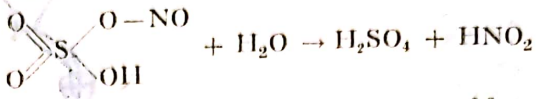
$$2\ HNO_3 \rightarrow 2\ NO + H_2O + 3\ O$$

$$NO + O \rightarrow NO_2$$

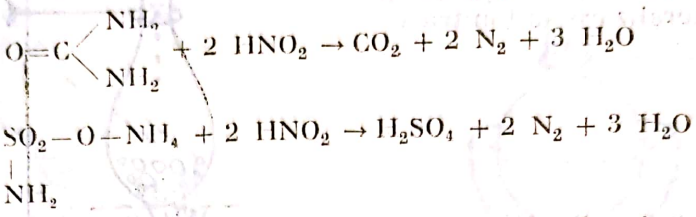
Modul de lucru. Se utilizează un balon Kjeldahl, deasupra căruia se găsește o pîlnie simplă, prin care se introduce în balon acid azotic aflat într-o pîlnie de siguranță (fig. 19).

Se introduc în balon 50—100 g material solid de analizat, proaspăt, fin divizat, sau 10—20 g material deshidratat. Dacă materialul este lichid, se concentrează prin evaporare (prin aceasta se îndepărtează și alcoolul, eventual prezent în material). Se adaugă în balon 8—16 ml acid sulfuric concentrat și cîteva perle de sticlă pentru reglarea fierberii și se încălzește pe sită la flacără mică (sau pe baia de nisip) sub nișă, urmărind să nu debordeze prin spumare. După carbonizare, se adaugă, cu picătura, acid azotic concentrat din pîlnia de picurare, continuîndu-se încălzirea. Operația se continuă pînă cînd lichidul devine clar și își menține culoarea galben-deschis, timp de 10—15 minute după încetarea adaosului de acid azotic. Se verifică absența substanțelor organice, astfel : 1—2 picături din soluția din balon se trec pe o sticlă de ceas, se diluează cu 1—2 ml apă distilată și se adaugă 1—2 picături de permanganat de potasiu 2% ; în cazul mineralizării complete, lichidul rămîne roz. Vaporii nitroși, aflați sub formă de acid nitrozilsulfuric sînt eliminați prin diluarea

lichidului din balon cu 50 ml apă, cînd se formează, prin hidroliză, acid sulfuric și acid azotos :



Acidul azotos se distruge prin adăugare de uree, sulfamat de amoniu, azidă de sodiu sau prin încălzire 10—15 minute :



Absența vaporilor nitroși se cercetează cu difenilamină sulfurică. Operația completă de mineralizare durează cîteva ore, în raport cu materialul de analizat.

În lichidul final, toxicii minerali se găsesc sub formă de sulfați sau sub formă de anioni în stare de oxidare superioară față de starea inițială (de exemplu, arseniați, dicromați etc.).

Avantajul metodei de mineralizare sulfonitrică constă în distrugerea completă a substanțelor organice, indiferent de natura lor.

Mineralizarea sulfonitroperclorică

Metoda se bazează pe marea capacitate oxidantă a acidului percloric la temperatura de fierbere a acidului sulfuric, asupra produsului carbonizat în prealabil, de amestecul sulfonitric.

Modul de lucru. a) *Tehnica Kahane :* Instalația constă dintr-un balon termorezistent, prin al cărui dop rodat trece tija unei pîlnii de separare. Tubul lateral al dopului se continuă cu un refrigerent descendent fixat la un balon Kitasato, în legătură cu o trompă de vid (fig. 20).

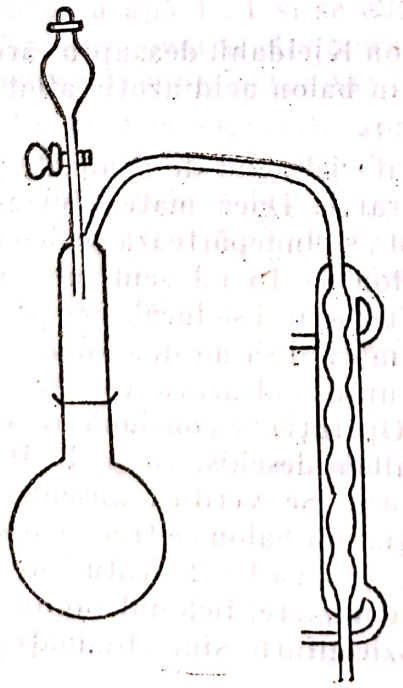


Fig. 20 — Instalație de mineralizare sulfonitroperclorică.

Se introduc în balon 50—100 g produs de analizat fin divizat, 2—4 ml acid azotic concentrat și 15—30 ml acid sulfuric concentrat. Se încălzește sub nișă, cu atenție, treptat, spre a evita o spumare prea abundentă. După degajarea vaporilor nitroși, cînd tot acidul azotic a reacționat, masa din balon este de culoarea brună-neagră. Se continuă încălzirea pînă la obținerea unui lichid siropos, care aderă la peretele balonului. În acest moment se introduce cu ajutorul pîlniei de picurare, un amestec de 2 volume acid percloric (d = 1,60) și 1 volum acid azotic concentrat, pînă cînd lichidul începe să se decoloreze. Se ține seama de faptul că reacția este puternic exotermă și că la utilizarea unui exces de acid percloric, s-ar forma, prin răcire, cristale de perclorat. Se completează mineralizarea prin adaos de acid azotic și încălzire pînă la obținerea unui reziduu incolor. Excesul de HNO_3 este îndepărtat ca în tehnica Dénigès. În final, se completează cu apă lichidul la un volum de 50—100 ml în raport cu cantitatea de produs de analizat.

Metoda are dezavantajul că există pericol de explozie, prin adaos de acid percloric în exces sau prin supraîncălzire locală.

b) *Semimicrometodă.* Pentru determinarea substanțelor terapeutice organometalice se poate aplica următoarea tehnică: într-o eprubetă se iau 0,1—0,2 g produs de analizat, se adaugă 1 ml acid sulfuric concentrat și se încălzește pe baia de apă la fierbere. Se adaugă, cu atenție, 1 ml amestec de acid azotic și acid percloric 1 : 1 și se încălzește încă 5 minute pe baia de apă. Lichidul galben-deschis este diluat cu 10 ml apă iar soluția obținută servește la identificarea toxicului.

Mineralizarea nitroperclorică

Metoda se aplică la mineralizarea probelor de urină și sînge pentru cercetarea anumitor metale.

Modul de lucru (v. Manganul). În cazul sîngelui se poate, în prealabil, deproteiniza cu acid tricloracetic 10%, după care se execută mineralizarea nitroperclorică (v. Plumbul, dozare în sînge).

Mineralizarea cu acid sulfuric sau azotic și permanganat de potasiu

Metoda se pretează la mineralizarea probelor de urină în care se cercetează mercurul (mineralizare cu acid sulfuric și permanganat de potasiu), plumbul (mineralizare cu acid azotic și permanganat de potasiu) sau alte metale.

Modul de lucru (v. Mercurul, dozare în urină și Plumbul, dozare în urină).

Mineralizarea cu acid sulfuric și perhidrol

Metoda se bazează pe accelerarea mineralizării substanței organice prin utilizarea, în final, a perhidrolului. Se pretează la mineralizarea probelor de urină, sînge, organe, în cantități mici.

Modul de lucru. Într-o eprubetă sau vas conic mic, termorezistente, se introduce materialul de analizat și se adaugă 5—10 ml acid sulfuric concentrat. Se încălzește pe baia de nisip pînă la carbonizare. Se adaugă, treptat, perhidrol și se continuă încălzirea. Cînd mineralizarea este completă, lichidul este incolor și clar.

Alte metode de mineralizare

a) *Mineralizarea cu acid sulfuric și azotat de amoniu (tehnica Stepanov)*: metoda se bazează pe mineralizarea substanței organice cu acid sulfuric și

Scanned with OKEN Scanner

azotat de amoniu, a cărui manipulare este mai puțin periculoasă decît a acidului percloric. Se pretează la mineralizarea produsului de analizat în cantități mici.

b) *Mineralizarea cu acid azotic și bisulfit de potasiu* (v. Cromul, dozare în sînge și urină).

I.2.3. IZOLAREA TOXICILOR ORGANICI NEVOLATILI

Izolarea toxicilor organici nevolatili (medicamente, alcaloizi, pesticide, acizi organici, aditivi alimentari, toxine vegetale și animale etc.) din diverse produse, se realizează prin extragere cu solvenți organici. O parte din acești toxici pot fi extrași prin electrodializă. De asemenea, există toxici (nicotina, amfetamina etc.), care pe lîngă extractibilitatea cu solvenți organici, sînt și antrenabili cu vapori de apă, operație urmată însă, în final, de extragerea distilatului cu solvenți organici.

Spre deosebire de izolarea toxicilor volatili și minerali, izolarea prin extragere cu solvenți organici a toxicilor organici nevolatili prezintă o serie de dificultăți și anume : extragerea, concomitent cu toxicul, și a unor produși jenanți (proteine, lipide, coloranți, metaboliți proprii etc.) ; pierdere de toxic prin adsorbție pe precipitatele din cursul operațiilor de purificare, sau oxidare, volatilizare, extragere incompletă etc.

Extragerea cu solvenți organici se bazează pe principiul conform căruia solubilitatea substanțelor este invers proporțională cu masa moleculară. Într-adevăr, toate substanțele toxice organice, indiferent de complexitatea moleculei, au masa moleculară cu mult mai mică decît a macromoleculelor proprii organismului.

În general, se urmărește ca solventul să extragă toxicul nealterat, precipitînd, în același timp, proteinele. Pentru a mări eficiența extractivă a solventului, se adaugă substanțe adjuvante (acizi sau baze).

Metodele de extracție cu solvenți organici se clasifică în raport cu eficiența (extracție prin echilibrare sau exhaustivă) și cu solventul (extracție generală sau selectivă).

Extracția prin echilibrare se bazează pe agitarea produsului de analizat cu o anumită cantitate de solvent, cînd se realizează un echilibru de repartiție a toxicului între substrat (produsul de analizat) și solvent — deci un echilibru între reținerea toxicului în substrat și extragerea lui în solvent. Din lichidul de extracție ajuns la echilibru, se determină toxicul.

Extracția exhaustivă se bazează pe epuizarea produsului de analizat cu solvent mereu proaspăt, operația repetîndu-se pînă la extragere completă. Se pot folosi extracția cu solvent care recirculă (în aparate Soxhlet, Kumagawa etc.) sau extracția cu solvent care se reînnoiește (în pîlnia de separare). Un sistem de extracție exhaustivă aplicat pentru lichide, se realizează în percola-

Scanned with OKEN Scanner

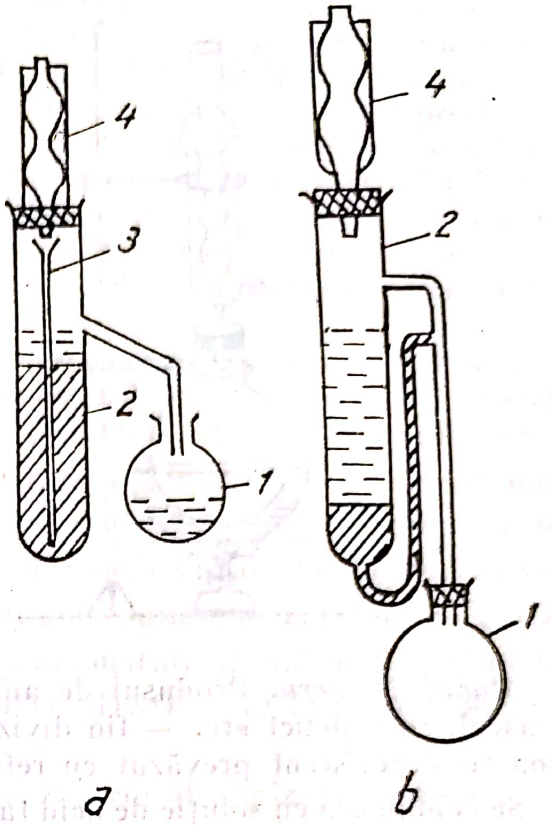


Fig. 21 — a. Percolator pentru solvenți mai ușori decît apa ; b. Percolator pentru solvenți mai grei decît apa. 1. Balon fierbător. 2. Corpul principal al percolatorului. 3. Pîlnie cu tijă lungă. 4. Refrigerent cu bule.

toare și este indicat, în special, în cazul coeficienților mici de repartiție, care reclamă o extracție îndelungată pentru ca operația să fie completă. Există două tipuri de percolatoare, în raport cu densitatea solventului, mai mică sau mai mare decît a apei (fig. 21).

Extracția generală se realizează cu solvenți organici cu capacitate de dizolvare a unei game largi de toxici și care, totodată, sînt și deproteinizanți, ca de exemplu, alcoolul etilic. Metoda este indicată în analiza toxicologică generală, cînd lipsesc indicații asupra naturii toxicului. Un exemplu de extracție generală este prima parte a metodei Stas-Otto-Ogier.

Extracția selectivă se referă la utilizarea solvenților specifici toxicului cercetat și presupune cunoașterea naturii acestuia.

În continuare se prezintă principalele metode de izolare a toxicilor organici nevolatili.

1. *Metoda Stas-Otto-Ogier*

Prima metodă eficientă de extragere cu solvenți organici a fost elaborată de Stas (1850) și se baza pe solubilitatea, în amestec hidroalcoolic a tartraților de alcaloizi, eliberarea alcaloizilor-bază prin alcalinizare și extragerea acestora cu eter etilic. Otto și, mai tîrziu, Ogier, au adus modificări importante.

Metoda utilizată în prezent se bazează pe solubilizarea toxicilor în amestec hidroalcoolic slab acidulat, urmată de îndepărtarea impurităților cu alcool concentrat. După îndepărtarea alcoolului, se extrag toxicii cu solvenți organici, întîi în mediu acid, apoi în mediu bazic.

Scanned with OKEN Scanner

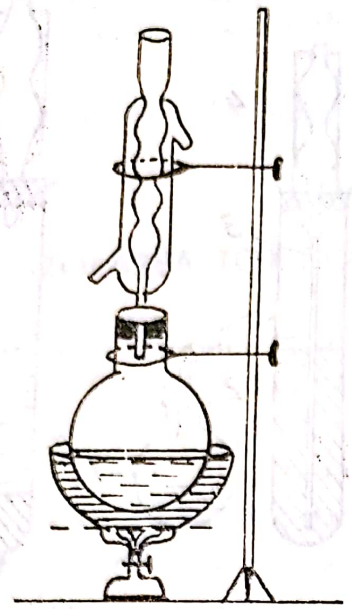


Fig. 22 — Instalație pentru extragerea toxicilor organici nevolatili (metoda Stas-Otto-Ogier).

Modul de lucru. Produsul de analizat (50—100 g) — organe, conținut stomacal, corp delict etc. — fin divizat și omogenizat, este introdus într-un balon termorezistent prevăzut cu refrigerent ascendent (fig. 22).

Se acidulează cu soluție de acid tartric 5% la pH 4 și se adaugă un volum dublu de alcool de 95° (volumul de alcool variază totuși în funcție de consistența produsului de analizat, astfel ca în final concentrația alcoolului să nu depășească 50%). Nu se folosesc acizi minerali, deoarece s-ar forma albuminați solubili și s-ar hidroliza unii alcaloizi (cocaina, atropina).

Se macerează 6—12 ore pe baia de apă la 50°C sau 3—6 ore la 70°C, se răcește și se filtrează.

Filtratul se purifică pentru îndepărtarea impurităților care ar deranja cercetarea toxicilor. Se îndepărtează alcoolul prin distilare sub presiunea scăzută, încălzind pe baia de apă la 50°C, sau prin evaporare într-o capsulă pînă la obținerea unui lichid siropos. Se răcește lichidul și se tratează, sub agitare continuă, cu un volum de 3—4 ori mai mare de alcool de 95°. Se lasă să se aglomereze precipitatele floconoase proteice, se filtrează, se spală precipitatul cu alcool. Se repetă operația de 3—4 ori, folosindu-se în final alcool absolut. Purificarea este completă atunci cînd, la adăugarea de alcool absolut, nu se mai formează flocoane proteice. Se filtrează, se îndepărtează alcoolul și se concentrează pe baia de apă pînă la consistență siropoasă, apoi se diluează cu apă la 50 ml. Îndepărtarea alcoolului este necesară pentru a asigura extragerea completă a toxicilor din faza apoasă, căci, în prezența alcoolului, extracția cu solvenți organici a toxicilor nu este completă deoarece o parte din aceștia rămîn în faza hidroalcoolică.

Lichidul apos acid astfel obținut este eliberat de majoritatea impurităților proteice. Pentru a elimina și restul de impurități (grăsimi, coloranți) se extrage lichidul apos acid, într-o pîlnie de separare, cu un volum egal de eter de petrol. *Extractul de eter de petrol* conține, pe lîngă impuritățile menționate,

și toxicii solubili în eter de petrol : acid salicilic, camfor, glutetimidă, insecticide organoclorurate etc. încît, dacă se cercetează acești toxici, nu se mai extrage cu eter de petrol, pentru că ei ar fi obținuți impurificați. În continuare, pentru o purificare mai avansată, se pot îndepărta lecitinele prin precipitare cu acetonă, filtrare și eliminarea acetonei prin distilare sau evaporare. *Lichidul apos acid* conține majoritatea toxicilor sub formă de tartrați (alcaloizi și medicamente cu caracter bazic), sub formă liberă (glucozizi, cantaridină, santonină) sau ca acizi neionizați (derivați barbiturici, acid salicilic, acid picric etc.). Acești toxici sînt extrași cu eter etilic, cloroform sau alți solvenți în mediu acid sau alcalin.

Extracția în mediu acid se realizează cu eter etilic, în volum dublu sau triplu, în pîlnia de separare. Se culege extractul eteric și se repetă operația de 2—3 ori. *Lichidul apos acid* se păstrează pentru extracție în mediu alcalin. *Extractele eterice acide* reunite se filtrează prin filtru uscat conținînd puțin sulfat de sodiu anhidru. Filtratul se evaporă pe baia de apă. Reziduul rezultat conține toxicii organici nevolatili acizi ca acizii salicilic, oxalic, picric, derivații barbiturici, cantaridina, santonina, picrotoxina, sulfamidele, cafeina și, parțial, teobromina, teofilina, fenacetina, meprobamatul, glutetimida, colchicina, veratrina, unele pesticide (paration, DDT, DNOC, ANTU), metaboliți cu caracter acid sau neutru.

Extracția în mediu alcalin se realizează prin alcalinizarea *lichidului apos acid* (rămas de la extracția cu eter etilic) la pH 9—10 cu amoniac 10% sau hidroxid de sodiu 5%, apoi extracție cu un volum dublu sau triplu de eter etilic, în pîlnia de separare. Se culege extractul eteric și se repetă operația de 2—3 ori. *Lichidul apos alcalin* se păstrează, iar *extractele eterice alcaline* reunite se filtrează, apoi filtratul se evaporă.

În această etapă se ține seama de următoarele :

— la cercetarea stricninei se adaugă întîi eterul (sau, preferabil, cloroform) și apoi se alcalinizează, sub agitare continuă, deoarece stricnina eliberată prin alcalinizare trece în formă cristalizată, greu extractibilă de către solvent. Or, alcalinizarea concomitent cu agitarea cu solvent, împiedică cristalizarea, alcaloidul fiind extras pe măsură ce trece în forma bazică ;

— la cercetarea toxicilor volatili (nicotină, amfetamină), extractul eteric alcalin se acidulează, înainte de evaporare, cu acid sulfuric 10% sau acid clorhidric 10%, spre a evita pierderile prin evaporare.

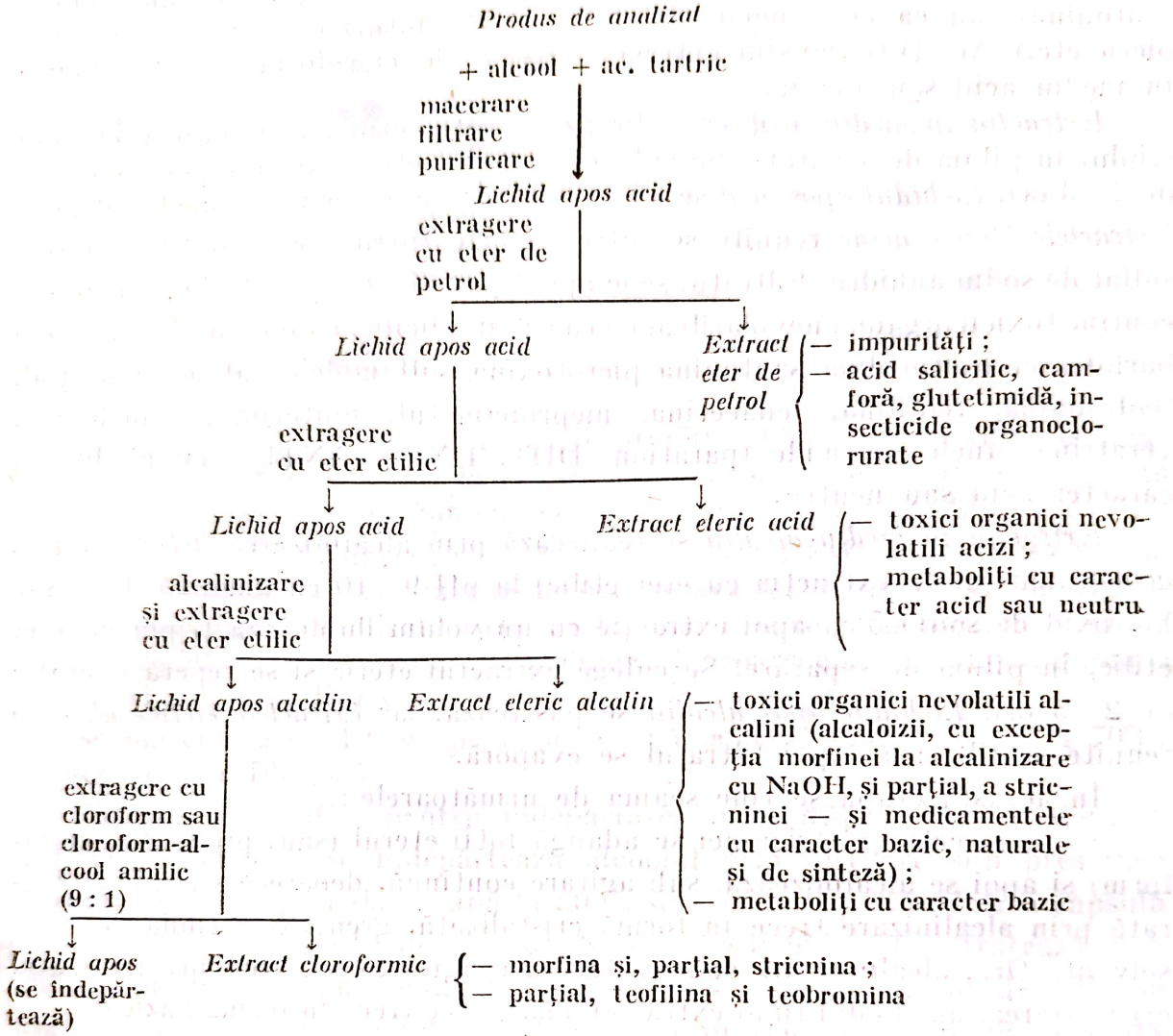
Extractul eteric alcalin conține toxicii organici nevolatili alcalini : alcaloizii (cu excepția morfinei la alcalinizaze cu hidroxid de sodiu și, parțial, a stricninei) și medicamentele cu caracter bazic, naturale sau de sinteză (fenotiazine, benzodiazepine, antidepresive triciclice, antimalarice, curarizante etc.) precum și metaboliții cu caracter bazic.

În lichidul apos alcalin, dacă a fost alcalinizat cu NaOH, se găsește totalitatea morfinei, ca fenolat neextractibil cu solvenți organici. În acest caz se acidulează cu HCl 10%, apoi se adaugă hidrogencarbonat de sodiu 5% pînă la pH 8,0—8,3 și se extrage cu cloroform sau cloroform-alcool amilic (9 : 1). În extractul cloroformic se găsește morfina. De asemenea, lichidul apos

alcalin conține o parte din stricnină și o parte din teofilină și teobromină, care se extrag cu cloroform. Operațiile descrise sînt prezentate în *schema 1.*

Schema 1

Extragerea toxicilor organici nevolatili prin metoda Stas-Otto-Ogier



2. *Metoda Dragendorff*

Metoda se bazează pe solubilizarea toxicilor în apă acidulată și precipitarea proteinelor cu alcool. Din filtrat se extrag toxicii cu solvenți organici, atît din mediu acid, cît și din mediu bazic.

Modul de lucru. La produsul de analizat se adaugă (dacă este consistent) un volum dublu de apă și 15—20 ml acid sulfuric 20%. Se macerează 2—3 ore pe baia de apă la 50°C, se răcește și se filtrează. Filtratul se concentrează pe baia de apă pînă la consistență siropoasă. Se tratează concentratul cu alcool de 90° de 3—4 ori volumul său și se macerează 24 ore. Se filtrează și se îndepărtează alcoolul prin distilare sub presiune scăzută. La lichidul siropos se adaugă 50 ml apă, se trece într-o pîlnie de separare și se extrage de 2 ori cu cîte 50 ml eter de petrol, pentru îndepărtarea impurităților (lipide etc.). Pe lichidul apos acid se execută extracția selectivă

cu cloroform, eter etc. În reziduu se identifică toxicii și metaboliții extractibili în mediu acid. Lichidul apos rămas se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 10% și se execută extracția selectivă cu eter, cloroform etc. În reziduu se identifică toxicii și metaboliții extractibili în mediu alcalin.

Metoda se pretează pentru o gamă largă de toxici extractibili din mediu acid și alcalin, însă este laborioasă și implică consum mare de solvenți.

3. *Metoda Florence (cu acid tricloracetic)*

Metoda se bazează pe solubilizarea toxicilor în apă și precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic care, totodată, asigură ionizarea bazelor organice. Din filtratul acid se extrag toxicii cu solvenți organici.

Modul de lucru. Se triturează 5—50 g organe cu un volum egal de acid tricloracetic 20%. Se macerează pe baia de apă la 35°C timp de 30 minute, cînd flocularea proteinelor este completă. Se răcește la 0°C pentru a se solidifica grăsimile. Sîngele (5—10 ml) se tratează cu un volum egal de acid tricloracetic 20%, se agită puternic și se lasă în repaus 15 minute. În ambele cazuri se filtrează și se spală cu apă depozitul de pe filtru, adăugînd apele de spălare la filtrat. Se neutralizează filtratul cu hidroxid de amoniu și se acidulează cu acid acetic. Se substituie astfel acidul tricloracetic, acid tare și nevolatil, cu acidul acetic, acid slab și volatil, deoarece acidul tricloracetic ar trece în solventul de exctracție și ar brunifica reziduul, pe cînd acidul acetic, în aceste condiții, se volatilizează. Din filtratul acid se extrag toxicii cu solvenți organici.

Metoda este simplă și rapidă. Se pretează pentru extragerea morfinei, stricninei, sulfamidelor, derivaților barbiturici, nu însă a heterozizilor și a unor alcaloizi ca atropina, cocaina, care sînt hidrolizați de aciditatea puternică a acidului tricloracetic. Metoda are dezavantajul de a reține în coagulul format la deproteinizare cu acid tricloracetic, o cantitate oarecare de toxic, deci nu se realizează o extracție completă.

4. *Metoda digestiei acide*

Metoda se bazează pe macerarea produsului de analizat cu acid clorhidric pe baia de apă, cînd precipită proteinele. Din filtrat se extrag toxicii cu eter în mediu alcalin.

Modul de lucru. Se tratează 10 g organe, sînge, urină, cu 10 ml apă și 16,5 ml HCl concentrat (pentru organe) sau 2 ml apă și 8 ml HCl concentrat (pentru sînge și urină). Se macerează 5—15 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește la gheață și se aduce la pH alcalin cu NaOH 10%. Se extrage de 2 ori cu cîte 500 ml eter (pentru organe) și 100 ml eter (pentru sînge și urină). Fazele eterice reunite se filtrează, se purifică prin spălare cu 10 ml NaOH 20%, apoi se îndepărtează NaOH prin spălare de 2 ori cu cîte 10 ml apă. Faza eterică rezultată se evaporă, iar în reziduu se identifică toxicii.

Metoda este recomandată pentru medicamentele cu caracter alcalin (fenotiazine, chinină etc.) și metaboliții cu caracter alcalin, dar este contraindicată pentru substanțele ușor hidrolizabile (atropină, cocaină, aconitină, benzodiazepine, paracetamol etc.).

5. *Metoda cu tungstat de sodiu (acid tungstic)*

Metoda se bazează pe deproteinizarea produsului de analizat cu tungstat de sodiu (acid tungstic). Din filtrat se extrag toxicii cu solvenți organici.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru. a) *Tehnica Street:* se diluează produsul de analizat (10—50 g), fin divizat, cu un volum variabil de apă (în funcție de produs). Se tratează cu un volum egal de soluție de acid tungstic obținut prin dizolvarea a 5 g tungstat de sodiu în 100 ml acid sulfuric 10%. Se agită și se filtrează. Se spală cu apă depozitul de pe filtru, adăugînd apele de spălare la filtrat. Din filtrat se extrag toxicii cu solvenți organici. b) *Tehnica Valov modificată:* se omogenizează produsul de analizat (50 g), fin divizat, prin mojarare cu 50 ml tungstat de sodiu 25% și 50 ml apă. Se trece amestecul într-un pahar Berzelius și se spală mojarul de 2—3 ori cu porțiuni mici de apă, care se adaugă la amestec. Se adaugă 50 ml sulfat acid de sodiu 50% și se încălzește, agitînd continuu, pînă ce culoarea amestecului se închide și precipitarea proteinelor este completă. Se filtrează la cald la trompa de vid, apoi se răcește. Din filtratul răcit se extrag toxicii cu solvenți organici.

Metoda este rapidă și se obțin, în general, filtrate limpezi. Este indicată în special pentru toxicii acizi și neutri, însă pentru unii toxici bazici nu se obține o extragere eficientă.

6. *Metoda Griffon-Le Breton (cu sulfat de sodiu anhidru)*

Metoda se bazează pe solidificarea produsului de analizat cu sulfat de sodiu anhidru, pentru a evita formarea ulterioară a emulsiei. Din masa solidă se extrag toxicii cu solvenți organici.

Modul de lucru. Se triturează 10—50 g produs de analizat cu nisip purificat, cu sulfat de sodiu anhidru de 2—3 ori cantitatea sa și, în funcție de natura toxicului, cu 5 g oxid de magneziu sau 1 g acid tartric. După ce se obține o masă solidă, neaderentă, la pereții mojarului — eventual procesul este accelerat prin menținerea mojarului cu conținutul său la gheață — se continuă prin una din următoarele variante:

— se trece conținutul mojarului într-un flacon Erlenmeyer, se adaugă un volum dublu sau triplu de solvent organic, se agită 15 minute, se lasă în repaus pentru separarea fazelor și se filtrează faza organică. Se repetă extragerea de 2—3 ori. Fazele organice reunite se evaporă pe baia de apă;

— se trece conținutul mojarului în cartușul filtrant al aparatului Soxhlet și se extrage exhaustiv cu eter, cloroform etc. Extractul organic se evaporă pe baia de apă;

— se folosește tehnica indicată la extragerea derivaților barbiturici (v. Derivații barbiturici).

7. *Metoda proteolizei (metoda Fabre)*

Metoda se bazează pe degradarea proteinelor pînă la peptide și aminoacizi sub acțiunea tripsinei. Din filtrat se extrag toxicii cu solvenți organici.

Modul de lucru. Se tratează produsul de analizat (5—50 g), fin divizat, cu de 3—5 ori volumul său de apă și se aduce la fierbere cîteva minute, cînd se distruge antitripsina existentă în sînge și unele organe. Se răcește la 50°C și se adaugă 1 g tripsină (sau pancreatină) la 50 g produs de analizat. Se mențin 12 ore la etuvă la 45—50°C, cînd are loc degradarea proteică. Se distruge excesul de enzimă prin fierbere, se filtrează și se concentrează la volum mic. Din concentrat se extrag toxicii cu solvenți organici.

Metoda este simplă și rapidă. Reziduurile rezultate după evaporarea solvenților sînt foarte pure. Toxicii ușor hidrolizabili (cocaină, atropină etc.) nu sînt afectați, ci sînt obținuți în stare cristalină în reziduu.

Scanned with OKEN Scanner

8. *Extragerea directă cu solvenți*

Odată cu introducerea pe scară largă a metodelor cromatografice (în strat subțire și gazoasă) și spectrofotometrice în U.V. și I.R. s-a lărgit și domeniul de utilizare a metodei de extragere a toxicilor cu solvenți, direct, fără o deproteinizare prealabilă, metodă folosită altădată numai atunci cînd toxicul era cunoscut (barbiturice, tranchilizante etc.).

Modul de lucru. Se acidulează produsul de analizat (5—50 g) lichid cu HCl 2 N, iar produsul solid se extrage cu apă acidulată cu HCl 2 N, apoi se filtrează (schema 2).

Se introduce un volum măsurat din probă într-o pîlnie de separare și se extrage cu de 5—10 ori volumul său de eter (dacă volumul probei este mic) sau de două ori cu cîte un volum cel puțin egal (dacă volumul probei este mare, de exemplu, 50 ml). După un minut de agitare se separă *extractul eteric acid*. Lichidul apos rămas în pîlnie se alcalinizează cu NH_4OH 2 N și se extrage cu cloroform de 5—10 ori volumul său (dacă volumul de lichid este mic) sau de două ori cu cîte un volum cel puțin egal (dacă volumul de lichid este mare, de exemplu, 50 ml). După un minut de agitare se separă *extractul cloroformic*.

În cazul cînd proba de analizat este simplă (de exemplu, lichid de spălătură gastrică) și dacă se apreciază concentrația toxicului ca fiind destul de mare, iar testul de identificare atît de sensibil încît să permită prezența unui procent mare de impurități, extractele obținute — acid eteric și cloroformic — sînt deshidratate cu sulfat de sodiu anhidru, filtrate și evaporate, iar în reziduu cercetați toxicii corespunzători.

În caz contrar, se trece la separarea fracțiunilor a, b, c, din extractul eteric acid și d, e, f, din extractul cloroformic.

Extractul eteric acid se epuizează de două ori cu hidrogencarbonat de sodiu 5% cîte 1/10 din volumul său (soluție proaspăt preparată), cînd în faza apoasă trec toxicii cu caracter puternic acid. Eterul rămas se epuizează de două ori cu hidroxid de sodiu 0,4%, cîte 1/10 din volumul inițial de extract eteric acid cînd în faza apoasă trec toxicii cu caracter slab acid sau fenolic. Eterul rămas constituie fracțiunea c și conține toxicii neutri. Faza apoasă de $NaHCO_3$ și faza apoasă de NaOH se acidulează cu acid clorhidric și se reextrag cu eter. Fazele eterice constituie *fracțiunea a* și *fracțiunea b*, care împreună cu *fracțiunea c* se deshidratează pe sulfat de sodiu anhidru, se filtrează și se evaporă. În reziduuri se cercetează toxicii corespunzători.

Extractul cloroformic se acidulează ușor cu acid clorhidric 2 N pentru evitarea pierderii prin volatilizare a bazelor volatile (amfetamina, petidina etc.) și se evaporă la sec. Reziduul, conținînd toxicii bazici sub formă de clorhidrați, se reia cu apă, se filtrează (la nevoie) și se extrage de două ori cu cîte un volum egal de cloroform. Faza cloroformică reprezintă *fracțiunea d* și conține toxicii bazici cu săruri solubile în cloroform (fenotiazine, majoritatea antihistaminicelor, narcoticele de sinteză, unii alcaloizi, ca papaverina, cocaina, aconitina). Faza apoasă rămasă se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 2 N și se extrage din nou de două ori cu cîte un volum egal de cloroform. Faza cloroformică reprezintă *fracțiunea e* și conține majoritatea bazelor azotate. Faza apoasă alcalină rămasă se acidulează, apoi se alcalinizează cu hidrogencarbonat de sodiu solid la pH 8,5 și se extrage de două ori

Scanned with OKEN Scanner

cu acetat de etil sau amestec cloroform-etanol. Faza organică reprezintă *fracțiunea f* și conține toxicii amfoteri. Fracțiunile d, e, f se deshidratează pe Na_2SO_4 anhidru, se filtrează și se evaporă. În reziduuri se cercetează toxicii corespunzători.

Extragerea directă cu solvenți este simplă și rapidă dar prezintă inconvenientul formării de emulsii, în special în cazul cloroformului. În general, volumul de solvent trebuie să depășească volumul probei (maximum de 10 ori), ceea ce, în cazul volumelor mari de probă, este neeconomic.

Schema 2

Extragerea toxicilor organici navolatili (după Clarke)

Faza I ..... *Extragerea directă* sau *Precipitarea proteinelor*

urină, sînge, lichide gastrice, produse farmaceutice (pulberi, tablete, capsule), corpuri delicte etc.

Probele lichide sînt acidulate, probele solide sînt extrase cu apă acidulată

urină, sînge, lichide gastrice, organe, materii fecale, corpuri delicte etc.

Filtratul apos este obținut prin metoda Stas-Otto-Ogier sau prin alte metode în care se precipită proteinele

Faza a II-a ..... *Filtrat* — se extrage cu eter

Reziduu conține toxicii insolubili în mediu apos acid

Extract eteric acid conține toți toxicii acizi și neutri solubili în eter, și anume:
- *fracțiunea a* — toxicii puternic acizi
- *fracțiunea b* — toxicii slab acizi sau fenolici
- *fracțiunea c* — toxicii neutri

Lichid apos acid se alcalinizează cu NH_4OH și se extrage cu cloroform

Extract cloroformic conține toți toxicii bazici solubili în cloroform și anume:
- *fracțiunea d* — toxicii bazici cu săruri solubile în cloroform
- *fracțiunea e* — toxicii bazici neamfoteri
- *fracțiunea f* — toxicii amfoteri

Lichid apos conține:
- toxicii hidrosolubili
- toxicii insolubili în eter și cloroform

Purificarea reziduurilor

Reziduul obținut după evaporarea solventului organic nu este pur, adică nu conține numai toxicul, ci și diverse impurități ca substanțe proteice, lipide, coloranți etc. care îngreunează și, uneori, împiedică recunoașterea toxicului; de exemplu, o cantitate mică de alcaloid pur este mai ușor de recunoscut decît o cantitate de zeci de ori mai mare, dar impură.

În general, purificarea reziduurilor se realizează prin modificarea pH-ului mediului (de la acid la alcalin și invers), îndepărtarea impurităților prin extragere cu solvenți, apoi revenirea la pH-ul inițial (acid sau bazic) și

extragerea toxicului purificat cu solvenți adecvați. Astfel, reziduurile izolate din mediu acid sînt solubilizate într-o soluție alcalină (cu hidroxid, hidrogencarbonat sau fosfat alcalin), pentru a trece toxicul sub formă ionizată. Din această soluție, impuritățile sînt extrase cu solvenți (eter de petrol, eter etilic, cloroform). Faza organică se îndepărtează, iar faza apoasă se acidulează și se extrage toxicul purificat cu solvenți adecvați. În mod similar, reziduurile izolate din mediu alcalin sînt solubilizate într-o soluție de acid mineral, iar din soluția acidă sînt extrase impuritățile. După îndepărtarea fazei organice, se alcalinizează faza apoasă și se extrage toxicul purificat cu solvenți adecvați.

În cazul special al unor toxici se pot alpica și alte metode de purificare, ținînd seama de proprietățile fizico-chimice ale acestora. Soluțiile conținînd toxicii neabsorbiți pe cărbune activat (acid salicilic, derivați barbiturici) sînt tratate, la cald, cu cărbune activat (cînd se adsorb o serie de impurități), apoi filtrate. În filtrat, se regăsește toxicul debarasat de impurități. Reziduurile conținînd glicozizi cardiotonici sînt solubilizate în apă caldă, soluția este tratată cu acetat bazic de plumb 10%, apoi filtrată. Alcaloizii proveniți din produse biologice prelevate de la cadavre necesită îndepărtarea ptomainelor (alcaloizi cadaverici). Reziduul se menține 24—48 ore la temperatura laboratorului, cînd se produce o oxidare și rezinificare, apoi se adaugă 1—2 ml acid clorhidric 0,1 N. În aceste condiții, alcaloizii se dizolvă, iar ptomainele rezinificate rămîn în reziduu.

În toate cazurile, trebuie să se țină seama de posibilitatea producerii de pierderi prin purificare, în special în cazul toxicilor volatili: amfetamină, metadonă, petidină, unii alcaloizi.

În prezent se pot utiliza metode moderne, ca electroforeza, cromatografia în strat subțire etc., pentru separarea cantităților foarte mici de toxici, atît de toxicii cu structură similară (un derivat barbituric de alți derivați barbiturici, nicotina de alcaloizii înrudiți din tutun etc.), cît și de impuritățile propriu-zise. Identificarea toxicilor efectuată pe cromatoplacă sau pe hîrtie este mult mai sensibilă decît identificarea în eprubetă sau pe sticla de ceas.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL II

METODE DE DETERMINARE A TOXICILOR

II.1. DETERMINAREA UNOR NEMETALE ȘI A COMPUȘILOR LOR

II.1.1. CLORUL

A. Izolare

Clorul se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante.

B. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu iodură de potasiu și amidon* este albăstrită de clor. Se prepară o soluție din 1 g amidon în 50 ml apă fierbinte. Separat, se prepară o soluție din 2 g KI și 1 g $ZnCl_2$ (cu rol de conservant) în 50 ml apă. Se amestecă ambele soluții și se impregnează hîrtii de filtru. Clorul deplasează iodul din iodura solubilă și colorează soluția de amidon în albastru :

$$2\ KI + Cl_2 = I_2 + 2\ KCl$$

Sensibilitatea reacției este de 1 mg/m³ aer. Reacția nu este specifică.

2. *Hîrtia îmbibată cu bromură și fluoresceină* este înroșită de clor. Se prepară o soluție din 0,1 g fluoresceină, 1 g carbonat de potasiu, 30 g bromură de potasiu, 1 ml KOH 10% și se aduce cu apă la 100 ml. Se impregnează hîrtii de filtru. Clorul deplasează bromul din bromură, iar acesta transformă fluorosceina (rezorcinftaleina), galben-verzuie, în eosină (tetrabromfluoresceină), roșie.

3. *Hîrtia îmbibată cu anilină și ortotoluidină* este albăstrită de clor. Se prepară o soluție din 10 ml soluție apoasă saturată de anilină (proaspăt distilată) 20 ml soluție apoasă saturată de ortotoluidină și 30 ml acid acetic glacial. Se impregnează hîrtii de filtru care, în prezența clorului, se colorează în albastru.

Scanned with OKEN Scanner

C. **Dozarea clorului (Cl_2)**

1. *Metoda nefelometrică*

Principiu

Clorul (Cl_2) este redus de acidul arsenios la Cl^-, care, în mediu de acid azotic, dă cu azotatul de argint, clorură de argint, nefelometrabilă :

$$2\ Cl_2 + As_2O_3 + 2\ H_2O = As_2O_5 + 4\ HCl$$

$$HCl + AgNO_3 = AgCl + HNO_3$$

Sensibilitatea metodei este de 2,5 μg clor/ml. Reacția nu este specifică, fiind interferată de ceilalți halogeni și de ionul cian.

Reactivi

1. Soluție absorbantă (soluție de As_2O_3 0,004 N). Se dizolvă 0,2 g As_2O_3 în aproximativ 10 ml KOH 40% într-un balon cotat de 1 000 ml, se neutralizează cu H_2SO_4 10% în prezența fenolftaleinei. Separat, se dizolvă 20 g $NaHCO_3$ în 500 ml apă și se adaugă la soluția de mai sus. Dacă soluția se colorează în roz, se decolorează cu H_2SO_4 și apoi se aduce la semn.

2. Acid azotic 20%.

3. Azotat de argint 10%.

4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,2102 g KCl (uscată la 100°) într-un balon cotat de 1 000 ml cu apă bidistilată. 1 ml = 0,1 mg clor.

Recoltarea probelor

Se aspiră 40 litri de aer cu un debit de 3 litri/minut prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două microabsorbitoare cu cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau 5 ml soluție, se adaugă 1 ml HNO_3 și 1 ml $AgNO_3$ și se omogenizează.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

După 30 minute, se omogenizează prin răsturnare și se măsoară turbiditatea la spectrofotometru cu dispozitiv TK, la $\lambda = 470$ nm, în cuva de 1 cm, în comparație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 20 și 100 μg clor, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Cu valorile obținute se construiește curba standard.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a clorului în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg clor/m^3 aer :

$$\text{mg clor/m}^3\ \text{aer} = \frac{C}{V}$$

Scanned with OKEN Scanner

în care :

C = concentrația clorului, în μg ;

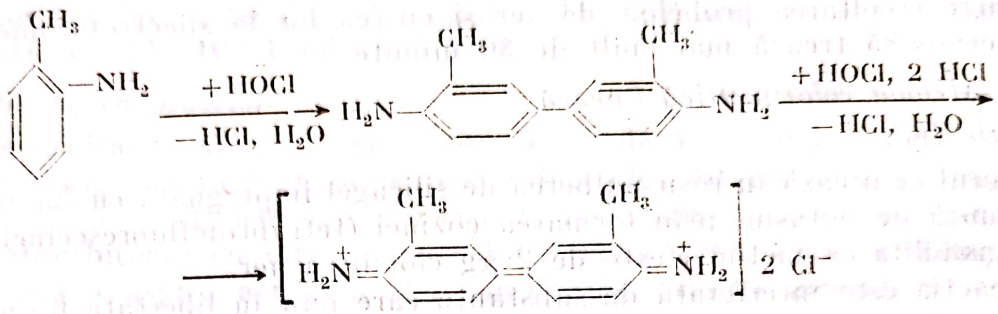
V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Clorul oxidează ortotoluidina, cu formarea unui compus galben, colorimetrabil :

$$Cl_2 + H_2O = HOCl + HCl$$



Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg clor/ml. Metoda nu este specifică.

Reactivi

1. Soluție absorbantă stoc. Se introduc 0,1 g ortotoluidină într-un balon cotat de 100 ml ; se adaugă 10 ml HCl concentrat și se completează la semn cu apă bidistilată. Se păstrează la rece și la întuneric. 2. Soluție absorbantă de lucru. Se diluează 1:10 soluția absorbantă stoc, cu apă bidistilată. Se prepară extemporaneu. 3. Acid clorhidric d = 1,19. 4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,3972 g cloramină T p.a. în 100 ml apă bidistilată (1 ml = 1 mg clor). 5. Soluție standard de lucru. Se diluează 1:100 soluția standard stoc, cu apă bidistilată (1 ml = 10 μg clor).

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 1 litru/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă de lucru. Se întrerupe aspirarea aerului la apariția culorii galben-verzui.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul fiecărui abosorbitor este transvazat cantitativ în cîte o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = 434 nm, în cuvă de 1 cm, în comparație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 2 și 10 μg prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2 ale clorului în fiecare dintre probe, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg clor/m³ aer :

$$\text{mg clor/m}^3 \text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V}$$

în care :

C_1, C_2 = concentrația clorului în cele două probe, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri

Observație

Între recoltarea probelor de aer și citirea lor la spectrofotometru nu este permis să treacă mai mult de 30 minute.

3. *Metoda colorimetrică lineară*

Principiu

Clorul colorează în roșu pulberea de silicagel impregnată cu fluoresceină și bromură de potasiu, prin formarea eozinei (tetrabromfluoresceinei).

Sensibilitatea metodei este de 2 μg clor/litru aer.

Reacția este interferată de substanțe care pun în libertate bromul din bromura de potasiu.

Reactivi

1. Acid clorhidric 6 N. 2. Reactiv indicator. Se dizolvă 30 g KBr și 1 g K_2CO_3 în 100 ml apă distilată și se adaugă 0,1 g fluoresceină, care a fost dizolvată în 1 ml KOH 10%. La întrebuințare, soluția obținută se diluează cu apă în proporție de 1 volum soluție la 6 volume apă. 3. Pulbere de silicagel. Silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,26—0,30 mm este fiert de două ori cu HCl 6 N, spălat cu apă pînă la reacție negativă pentru ionul clor, apoi uscat și calcinat 2 ore la 750°C. 4. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g silicagel cu 12 ml reactiv indicator. Se omogenizează și se usucă la 100°C. Pulberea se păstrează în borcane cu dop rodat și este stabilă 4 luni. 5. Tuburi indicatoare (vezi Oxidul de carbon).

Modul de lucru

Se aspiră aer prin tub cu ajutorul analizorului de gaze universal UG-1. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului, gradate în mg clor/l aer, corespunzînd concentrațiilor :

0—0,60 mg/l, la aspirarea a 300 ml aer în 6 minute ;

0—0,15 mg/l, la aspirarea a 125 ml aer în 4 minute.

D. Dozarea ionului clor (Cl^-)

1. *Metoda nefelometrică* (se procedează ca la Cl_2)

2. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Ionul clor (Cl^-) reacționează cu sulfocianura mercurică, formînd tetracloromercuriatul și eliberînd ionul sulfocian, care cu fierul trivalent dă sulfocianură ferică, roșie, colorimetrabilă :

$$4\ Cl^- + Hg(SCN)_2 = [HgCl_4]^{2-} + 2\ SCN^-$$

$$3\ SCN^- + Fe^{3+} = Fe(SCN)_3$$

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea reacției este de 0,5 μg Cl^-/ml.

Metoda nu este specifică, fiind interferată de ionul fosfat și de fluorurile alcaline.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : apă bidistilată, lipsită de Cl^-. 2. Sulfocianură mercurică. Se dizolvă 0,3 g $Hg(SCN)_2$ în 100 ml metanol sau apă bidistilată. 3. Alaun feric amoniacal. Se dizolvă 6 g $(NH_4)_2Fe_2(SO_4)_4 \cdot 24\ H_2O$ în 100 ml HNO_3 5 N. 4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1649 g NaCl sau 0,2044 g KCl în 100 ml apă bidistilată. 1 ml = 1 mg Cl^-. 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 2,5 : 100·1 ml = 25 μg Cl^-.

Recoltarea probelor

Se aspiră 5—10 litri aer cu un debit de 1—2 litri/minut prin două absorbitoare, montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 20 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare se iau, într-un balon cotat sau eprubetă gradată de 25 ml, 10 ml soluție. Se adaugă cîte 2,5 ml soluție $Hg(SCN)_2$ și alaun feriamoniacal și se aduce la semn cu apă bidistilată.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

După 10 minute, se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = = 470 nm, în cuva de 1 cm, în comparație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 50 și 250 μg Cl^-, prin puncte din 50 în 50, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a Cl^- în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Cl^-/m^3 aer :

$$\text{mg } Cl^-/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația Cl^-, în μg;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

II.1.2. BROMUL

A. Izolare

Bromul se izolează din aer, prin reținere în soluții absorbante și din produse biologice prin calcinare cu $NaCO_4$ și KNO_3.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

1. *Hîrtia îmbibată cu fluoresceină* este înroșită de brom. Reactivul se prepară ca la clor, fără însă a adăuga KBr.

2. *Hîrtia îmbibată cu iodură de potasiu și amidon* este înălbăstrită de brom (v. Clorul).

3. *Hîrtia îmbibată cu reactiv Schiff* este colorată în albastru violet de brom (reacția Guareschi).

C. **Dozare**

1. *Metoda nefelometrică* (se procedează ca la Cl_2).

2. *Metoda spectrofotometrică* (se procedează ca la Cl_2).

3. *Metoda colorimetrică liniară.*

Principiu

Bromul colorează în roșu pulberea de silicagel impregnată cu fluoresceină, prin formarea eozinei (tetrabromfluoresceinei).

Sensibilitatea metodei este de 2 μg Br_2/litru aer.

Reacția nu este interferată de clor și fluor.

Reactivi

1. Reactiv indicator. La 100 ml soluție carbonat de potasiu 1% se adaugă 0,1 g fluoresceină, care a fost dizolvată în 1 ml KOH 10%. În momentul întrebuințării, soluția obținută se diluează cu apă în proporție de 1 volum soluție la 10 volume apă. 2. Pulbere de silicagel. Silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,20—0,25 mm este fiert de cîteva ori cu apă, esorat și uscat la 85°C. 3. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g pulbere de silicagel cu 20 ml reactiv indicator, se omogenizează și se usucă 2 ore la 65°C. 4. Tuburi indicatoare. Se folosesc tuburi de sticlă cu lungimea de 45 mm și diametrul interior de 2,5 mm, care se pregătesc ca la oxidul de carbon, realizînd însă un strat de pulbere de 40 mm.

Modul de lucru

Se aspiră cu un debit uniform, un litru de aer în decurs de 20 minute. Se măsoară lungimea stratului colorat și se calculează mg brom la litru aer, după formula :

$$\text{mg brom/l aer} = 0{,}94\,\frac{l}{V}$$

în care :

l = lungimea stratului colorat, în mm ;
V = volumul de aer recoltat, în ml ;
0,94 = coeficient stabilit experimental (μg brom corespunzînd la 1 mm strat colorat).

II.1.3. FLUORUL

A. **Izolare**

Fluorul se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante și din urină prin microdifuziune.

B. **Identificare**

1. *Hîrtia îmbibată cu reactiv zirconiu-alizarinsulfonat de sodiu* este decolorată de fluor. Reactivul se prepară din volume egale de soluție apoasă de azotat de zirconiu 0,4% și soluție alcoolică de alizarinsulfonat de sodiu 0,4%. La 1 ml din acest amestec se adaugă 4 ml HCl 3%.

C. **Dozarea fluorului (F_2) din aer**

1. *Metoda colorimetrică liniară*

Metoda se bazează, ca și în cazul clorului, pe formarea eozinei (tetrabromfluoresceinei), roșie. Sensibilitatea metodei este de 0,34 μg F_2/litru aer.

Prin tubul indicator, pregătit ca la clor, se aspiră cu un debit uniform un litru de aer în decurs de 20 minute. Se măsoară lungimea stratului colorat și se calculează mg fluor la litru aer, după formula :

$$\text{mg fluor/l aer} = 0{,}34 \frac{l}{V}$$

în care :

l = lungimea stratului colorat, în mm ;
V = volumul de aer recoltat, în ml ;
0,34 = coeficient stabilit experimental (μg fluor corespunzînd la 1 mm strat colorat).

D. **Dozarea ionului fluor (F^-) din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Ionul fluor (F^-) formează complecși nedisociabili cu fierul trivalent. Excesul de ioni ferici se dozează ca sulfocianură ferică, roșie, colorimentrabilă :

$$6\ NaF + FeCl_3 \rightarrow Na_3[FeF_6] + 3\ NaCl$$

$$3\ SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe(SCN)_3$$

Sensibilitatea reacției este de 3 μg F^-/5 ml.

Metoda nu este specifică, fiind interferată de ionul clor.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : apă bidistilată. 2. Clorură ferică, $FeCl_3$, soluție 0,05% în alcool. Se prepară extemporaneu. 3. Sulfocianură de potasiu, KSCN sau de amoniu, NH_4SCN, 10%. 4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,2210 g NaF (uscată la 80—100°C) în 1 000 ml apă bidistilată. 1 ml = 0,1 mg F^-. 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1:10, 1 ml = 10 μg F^-.

Recoltarea probelor

Se aspiră 25 l aer cu un debit de 0,5 l/minut, prin două absorbitoare, montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 20 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau 5 ml soluție și se adaugă 0,1 ml $FeCl_3$ 0,05% (măsurat cu precizie) și 0,5 ml KSCN 10%.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

După 30 minute, se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 470$ nm, în cuvă de 1 cm, în comparație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 30 μg F^- prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 4 (pentru că s-a lucrat cu 1/4 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a F^- în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg F^-/m^3 aer:

$$\text{mg } F^-/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația în F^-, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Pentru evitarea corodării de către fluor a pereților sticlăriei utilizate (absorbitoare, sticla cu soluția standard etc.) aceasta se parafinează astfel: în vasele uscate la etuvă, se toarnă parafină topită și se acoperă prin rotire pereții interiori ai sticlăriei cu un strat de parafină care, după răcire, aderă uniform.

2. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiul metodei

Ionul fluor colorează în galben pulberea de porțelan impregnată cu o soluție alcalină de albastru de bromfenol.

Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg HF/l aer.

Reacția este interferată de acizi și alcalii.

Reactivi

1. Albastru de bromfenol, soluție 1% în alcool. 2. Alcool etilic 96°. 3. Hidroxid de sodiu 0,1 N. 4. Amestec de reactivi. La 10 ml soluție alcoolică de albastru de bromfenol, se adaugă 1,5 ml NaOH 0,1 N. 5. Pulbere de porțelan (vezi Amoniacul). 6. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g pulbere de porțelan cu 2 ml amestec de reactivi. Se omogenizează și se lasă 10 minute la temperatura laboratorului, apoi se usucă 30 minute la 35°C. Pulberea se păstrează în borcane de culoare închisă și este stabilă timp de o lună. 7. Tuburi indicatoare. Se folosesc tuburi de sticlă cu lungimea de 50 mm și diametrul interior de 2,5 mm, care se pregătesc ca la oxidul de carbon, realizînd însă un strat de pulbere de 30 mm.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Se aspiră 1 litru aer timp de 5—6 minute. Culoarea galbenă formată este stabilă cîteva ore. Se măsoară lungimea stratului colorat și se obține concentrația în μg HF/l aer, după următoarea schemă :

lungimea stratului colorat (mm)	2—3	5—6	8—9	10—11	14—15
concentrația HF (μg/litru)	0,5	1—1,5	2,5	5	9—10

D. Dozarea ionului fluor (F^-) din urină

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Metoda se bazează pe izolarea fluorului din urină prin microdifuziune și apoi pe reacția de decolorare provocată de acesta asupra lacului de azotat de toriu-Spadns.

Reactivi

1. Hidroxid de sodiu, soluție alcoolică 0,05 N. 2. Sulfat de argint p.a. 3. Acid sulfuric 50% (în volume). 4. Azotat de toriu, soluție 0,004 M (0,2280 g în 100 ml apă). 5. Spadns, sulfanilazocromotrop (sarea trisodică a acidului 2-(p-sulfofenilazo)-1,8-(dioxinaftalin)-3,6-disulfonic), soluție 0,004 M (0,2282 g în 100 ml apă). 6. HCl soluție 0,05 N. 7. Lacul de azotat de toriu — Spadns se prepară extemporaneu, adăugînd într-un balon cotat de 100 ml : 2,50 ml soluție azotat de toriu 0,004 M ; 5,00 soluție Spadns ; 0,04 ml HCl 0,05 N și se aduce la volum de 100 ml cu apă bidistilată. 8. Soluție standard stoc : soluție de fluorură de sodiu (uscată în prealabil la 100°C), 2,2105 g la 1 000 ml apă, 1 ml = 1 mg fluor. 9. Soluție standard de lucru : se diluează soluția stoc 1:100 cu apă, 1 ml = 10 μg fluor. 10. Timol, soluție alcoolică 20%.

Materialul de analizat

Urina se recoltează în sticle de polietilenă. Probele de urină care nu se analizează în aceeași zi se pot păstra prin adăugare de conservant (0,25 ml soluție alcoolică de timol pentru 100 ml urină).

Modul de lucru

a. *Difuziunea :* se folosesc cutii din polistiren cu diametrul de 7,5 cm și înălțimea de 2,5 cm (cutii utilizate ca ambalaje de medicamente).

În capacele cutiilor se măsoară 2 ml soluție alcoolică de hidroxid de sodiu. Lichidul se repartizează uniform pe fundul capacului, prin agitare ușoară giratorie. Se evaporă alcoolul ținînd capacele într-o etuvă la 55—60°C. Capacele trebuie să fie bine uscate.

În cutia de polistiren se măsoară 2 ml urină, se adaugă 0,1 g sulfat de argint și 2 ml acid sulfuric 50%. Se evită amestecarea lichidelor. Se acoperă cutia cu capacul pregătit, se asigură etanșeitatea prin ungerea cutiilor cu unsoare de silicon, se amestecă prin agitare ușoară giratorie lichidele din cutie, se așază cutiile într-o etuvă la 55—60°C și se lasă 24 ore.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea colorimetrică : reacția de culoare se efectuează în capacul cutiei.

Se măsoară în capacele răcite la temperatura laboratorului 2 ml apă bidistilată și apoi, sub agitare continuă pe agitator electromagnetic : 4 ml HCl 0,05 N și 4 ml lac de azotat de toriu-Spadns.

Se măsoară extincția probelor (Ep) la spectrofotometru la $\lambda = 570$ nm în cuvă de 1 cm.

În paralel cu probele se pregătește și un martor al reactivilor prelucrat ca și probele, inclusiv difuziunea. Se măsoară extincția martorului (Em). Atît probele cît și martorul se citesc în comparație cu apă distilată.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 5 μg F^- în condițiile descrise mai sus. Curba este descendentă, intensitatea culorii fiind invers proporțională cu concentrația de fluor în probă.

Calcul

Se folosește relația :

$$\mu g\ F^-/\text{probă (ml urină utilizați)} = \frac{Em - Ep}{A}$$

care :

Em și Ep = extincția martorului, respectiv a probei ;
A = factorul de pantă a curbei

$$A = \frac{Em - Es}{C}$$

în care :

Es = extincția standardului
C = concentrația

Rezultatele finale se exprimă în mg F^-/litru urină.

Observație

Curba de standardizare nu este lineară pentru concentrații care depășesc 8 μg F^-, dacă concentrația probei depășește această valoare, se repetă determinarea cu o diluție de urină.

Interpretarea rezultatelor

La persoanele neexpuse, fluorul urinar poate atinge valori de 2 mg/litru, variind în diferite regiuni geografice, în special după aportul de fluor din apa potabilă. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor la muncitorii expuși, acestea vor fi comparate cu valorile de fluor urinar ale unui lot martor, muncitori din aceeași unitate, dar fără expunere profesională la fluor.

II.1.4. IODUL

A. Identificare

1. *Soluția de amidon* se albăstrește la trecerea aerului cu vapori de iod.

2. *Soluția de alcool polivinilic 1%* se înroșește la trecerea aerului cu vapori de iod.

Scanned with OKEN Scanner

II.1.5. HIDROGENUL SULFURAT

A. Izolare

Hidrogenul sulfurat se izolează din aer, prin reținere în soluții absorbante, și din sînge (proaspăt), prin antrenare cu vapori de apă.

B. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu acetat de plumb este înnegrită de* H_2S cu formare de PbS.

2. *Hîrtia îmbibată cu acetat de cadmiu* este îngălbenită de H_2S cu formare de CdS.

3. *Hîrtia albastră iod-amidonată* este decolorată de H_2S în urma reducerii iodului de către H_2S:

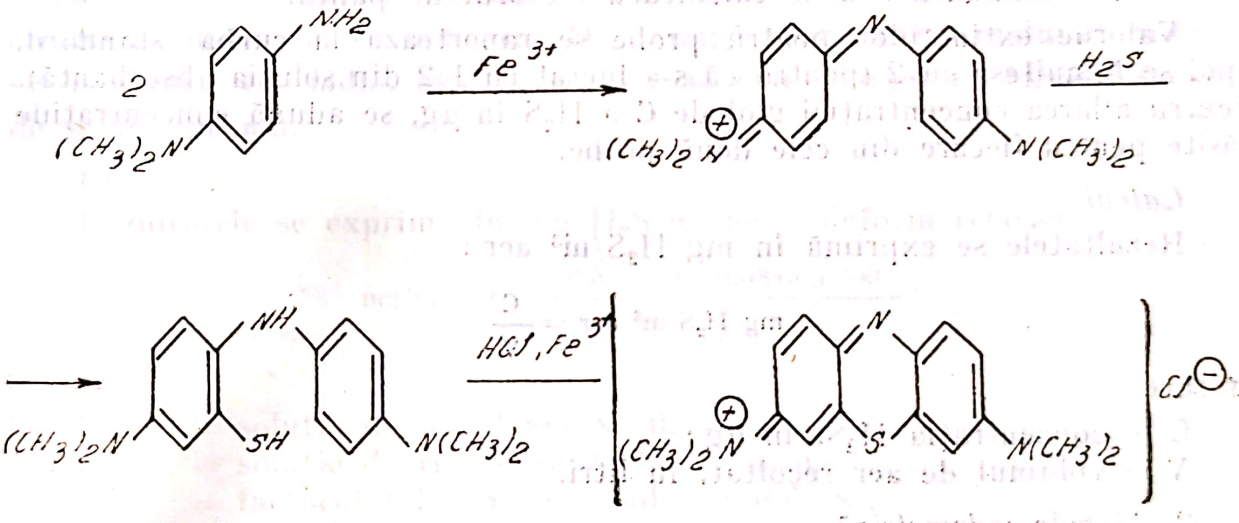
$$H_2S + I_2 = 2\ HI + S$$

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Hidrogenul sulfurat și paradimentilfenilendiamina, în prezența clorurii ferice, formează clorura de tetrametildiaminotiazină (albastru de metilen), colorimetrabilă:



Sensibilitatea metodei este de 0,05 μg/ml. Metoda este specifică pentru H_2S.

Reactivi

1. Soluție absorbantă: acetat de zinc, soluție 1% sau o suspensie alcalină de sulfat de cadmiu, $CdSO_4 \cdot 5\ H_2O$, preparată prin dizolvarea a 4,3 g sulfat de cadmiu în 20 ml apă; separat, se dizolvă 0,3 g NaOH în 20 ml apă. Soluția de $CdSO_4$ se adaugă peste soluția de NaOH și se completează la 1 000 ml cu apă distilată. Amestecul, fiind o suspensie, se agită energic înainte de întrebuințare. 2. Paradimetilfenilendiamină clorhidrică. Se dizolvă 0,5 g paradimetilfenilendiamină în 150 ml HCl d = 1,19. Separat, se dizolvă 0,5 g clorură ferică, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$, în 50 ml apă distilată. Se amestecă ambele soluții. Reactivul se conservă în flacon brun și la rece mai mult timp. 3. Soluție standard stoc. Într-un balon cotat de 1 000 ml se dizolvă 0,3—0,4 g sulfură de sodiu p.a. în apă distilată fiartă și răcită. Conținutul în sulfură

de sodiu se determină prin titrare iodometrică, 1 ml soluție 0,01 N iod = = 0,3903 mg Na_2S. 4. Soluție standard de lucru. Se diluează cu apă distilată fiartă și răcită soluția standard stoc, astfel încît să se obțină o soluție în care 1 ml = 2 μg H_2S. Întrucît soluția apoasă de Na_2S este ușor oxidabilă, soluția standard de lucru se prepară extemporaneu.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 2 l aer, cu un debit de 0,15 l/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul fiecărui absorbitor se transvazează cantitativ în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau cîte 5 ml soluție și se adaugă 1 ml de soluție clorhidrică de paradimetilfenilendiamină ; se lasă în repaus 30 minute.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la un spectrofotometru, la $\lambda = 650$ nm, în cuva de 1 cm, în comparație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 5 μg H_2S, prin punct din 1 în 1, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă). Pentru aflarea concentrației globale C a H_2S în μg, se adună concentrațiile găsite pentru fiecare din cele două probe.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg H_2S/m^3 aer :

$$\text{mg } H_2S/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația H_2S, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. *Metoda iodometrică*

Principiu

Hidrogenul sulfurat este reținut ca sulfură de cadmiu, care se titrează iodometric :

$$CdCl_2 + H_2S = CdS + 2\ HCl$$

$$CdS + HCl = CdCl_2 + H_2S$$

$$H_2S + I_2 = S + 2\ HI$$

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 = Na_2S_4O_6 + 2\ NaI$$

Reactivi

1. Soluție absorbantă. Se dizolvă 20 g $CdCl_2$ în 900 ml apă distilată, se adaugă 20 ml NaOH 0,5 N și se completează la 1 000 ml cu apă dis-

tilată. 2. Acid clorhidric, d = 1,19. 3. Soluție de iod 0,005 N, proaspăt preparată. 4. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,005, proaspăt preparată. 5. Soluție de amidon 1% în soluție saturată de NaCl.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 0,5 l/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 25 ml soluție absorbantă. Operația de recoltare se întrerupe atunci cînd în soluția absorbantă apare o tulbureală galbenă. Dacă aerul de analizat conține, în afară de H_2S, și SO_2, este necesar să se barboteze aer neimpurificat (10—12 litri) prin soluțiile absorbante, pentru a îndepărta SO_2, deoarece acesta are acțiune reducătoare asupra soluției de iod.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 25 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitoarelor se reunește prin transvazare într-un Erlenmeyer cu dop rodat de 500 ml. Se spală fiecare absorbitor, de două ori, cu cîte 10 ml apă, aducînd apele de spălare în Erlenmeyer. Se adaugă 25 ml soluție de iod. Se spală fiecare absorbitor, de trei ori, cu cîte 15 ml HCl, aducînd apele acide în Erlenmeyer și închizîndu-l cu dopul după fiecare adaos. După cîteva minute, se dozează excesul de iod cu soluție de tiosulfat în prezența amidonului ca indicator. Dacă, după adăugarea acidului clorhidric, s-a consumat tot iodul, este necesar să se mai adauge un exces cunoscut de soluție de iod.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg H_2S/m^3 aer, conform relației :

$$mg/m^3 \text{ aer} = \frac{(25 - a.f.) \cdot 0{,}0846 \cdot 1\,000}{V}$$

în care :

25 = soluție de iod 0,005 N, în ml ;
a = soluție de tilosulfat 0,005 N, în ml ;
f = factorul soluției de tiosulfat 0,005 N ;
0,0846 = factor de echivalență (1 ml soluție I_2 0,005 N = 0,0846 mg H_2S);
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Hidrogenul sulfurat colorează în brun-negru pulberea de porțelan impregnată cu acetat de plumb, prin formare de PbS.

Sensibilitatea metodei este de 2 μg H_2S/l aer. Reacția este interferată de mercaptani.

Reactivi

1. Acetat de plumb $(CH_3COO)_2Pb \cdot 3\,H_2O$, 15% în acid acetic 2%. 2. Clorură de bariu 2% ; 3. Amestec de reactivi : volume egale de acetat

de plumb și clorură de bariu ; 4. Pulbere de porțelan (vezi Amoniacul). 5. Pulbere indicatoare. Se tratează o cantitate de pulbere de porțelan cu un exces din amestecul de reactivi. Se esorează și se usucă la 100°C. Pulberea se păstrează în fiole de sticlă închise și este stabilă 30 luni ; 6. Tuburi indicatoare (vezi Oxidul de carbon).

Modul de lucru

Se aspiră aer prin tub cu ajutorul analizorului de gaze universal UG-1. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului gradate în mg H_2S/l aer, corespunzînd concentrațiilor :

0—0,06 mg/l, la aspirarea a 250 ml aer, în decurs de 3 minute ;

0—1,36 mg/l, la aspirarea a 30 ml aer, în decurs de 2 minute.

II.1.6. DIOXIDUL DE SULF

A. **Izolare**

Dioxidul de sulf se izolează din aer, prin reținere în soluții absorbante și din produse biologice (proaspete), prin distilare după acidulare.

Dioxidul de sulf se poate găsi în prezența acidului sulfuric. Acesta se află sub formă de aerosoli, formînd o „ceață", care rezultă și din oxidarea dioxidului de sulf la trioxid de sulf sub acțiunea oxigenului atmosferic, apoi prin reacție cu vaporii de apă din aer.

De asemenea, alături de dioxidul de sulf se pot găsi, în aer, și alți produși — hidrogen sulfurat, sulfură de carbon — fiind necesară, uneori, dozarea separată a componenților amestecului.

B. **Identificare**

1. *Hîrtia îmbibată cu roșu de Congo* este albăstrită de dioxidul de sulf.

2. *Cu acid iodic 1% și amidon*, dioxidul de sulf dă o culoare albastră, datorită reducerii acidului iodic la iod de către SO_2 :

$$5\ SO_2 + 2\ HIO_3 + 4\ H_2O = I_2 + 5\ H_2SO_4$$

3. *Cu nitroprusiat de sodiu și sulfat de zinc*, dioxidul de sulf dă o culoare roz-roșie. Se aspiră aerul într-un amestec format din volume egale de sulfat de zinc 20% și acetat de sodiu soluție saturată, se adaugă cîteva picături de nitroprusiat de sodiu 5%, cînd apare o culoare roșie. Sensibilitatea reacției crește în prezența ferocianurii de potasiu, $K_4[Fe(CN)_6]$, deoarece aceasta formează cu $ZnSO_4$, lacul de $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$, insolubil, care în condițiile reacției se colorează în roșu.

Reacția poate fi executată și cu benzi de hîrtie îmbibate în reactivii menționați și expuse în atmosfera de cercetat. Se poate, de asemenea, aspira aerul prin hîrtiile indicatoare fixate într-o flanșă (pîlnie Palmer).

Scanned with OKEN Scanner

C. Dozarea dioxidului de sulf

1. *Metoda nefelometrică*

Principiu

Dioxidul de sulf este oxidat de $KClO_3$ la H_2SO_4, care cu $BaCl_2$ în mediu de HCl dă opalescență, datorită formării de $BaSO_4$:

$$3\ SO_2 + KClO_3 + 3\ H_2O = 3\ H_2SO_4 + KCl$$

$$H_2SO_4 + BaCl_2 = BaSO_4 + 2\ HCl$$

Sensibilitatea metodei este de 10 μg/ml. Precizia este de 10 μg.

Reactivi

1. Soluție absorbantă. Se dizolvă 5 g $KClO_2$ (lipsit de ioni sulfat) în 100 ml apă bidistilată, apoi se filtrează ; 2. Acid clorhidric 0,1 N ; 3. Clorură de bariu, $BaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, soluție 10% ; 4. Soluție standard stoc. Se recristalizează K_2SO_4 și se usucă la 100°C. Se cîntăresc 0,0272 g și se aduc într-un balon cotat de 100 ml cu apă distilată. 1 ml = 0,1 mg SO_2.

Recoltarea probelor

Se aspiră 15—20 litri aer, cu un debit de 0,5 l/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două microabsorbitoare cu cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare se iau 5 ml soluție și se adaugă 1 ml HCl 0,1 N, apoi 1 ml $BaCl_2$ 10%. Se agită și, după 10 minute, se compară turbiditatea probelor de analizat astfel :

— direct cu aceea a probelor din scara de standarde, pe un fond negru ;

— la spectrofotometrul Spekol, cu accesorul FK, la $\lambda = 420$ nm în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 20 și 100 μg, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Cu valorile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a SO_2 în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg SO_2/m^3 aer :

$$\text{mg } SO_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația SO_2, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

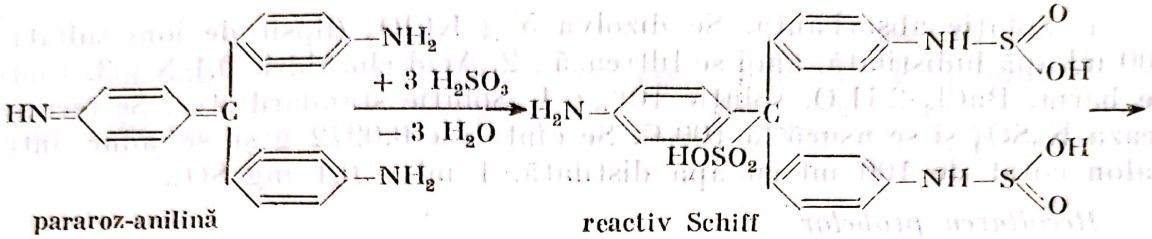
2. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

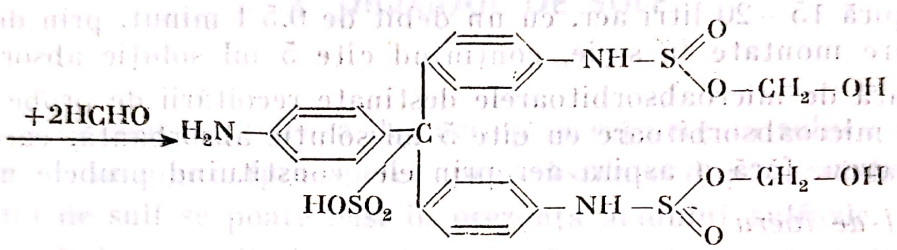
Dioxidul de sulf formează cu tetracloromercuriatul de sodiu complexul $Na_2[Hg(SO_3)_2]$ care este mai stabil față de oxigenul atmosferic decît SO_3^{2-}. La tratarea complexului cu pararozanilină (parafuxină), se eliberează SO_3^{2-}, formîndu-se reactiv Schiff. Acesta, în prezența formaldehidei, dă un compus trifenilmetanic roz, colorimetrabil :

$$SO_2 + H_2O = H_2SO_3$$

$$Na_2[HgCl_4] + 2\ H_2SO_3 = Na_2[Hg(SO_3)_2] + 4\ H^+ + 4\ Cl^-$$



pararoz-anilină — reactiv Schiff



Sensibilitatea metodei este de 0,3 μg/ml. Metoda este specifică, în aceste condiții, pentru SO_2.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : tetracloromercuriat de sodiu. Se amestecă, într-un balon cotat la 1 000 ml, o soluție care conține 27,2 g clorură mercurică, $HgCl_2$, p.a. în aproximativ 400 ml apă distilată, cu o soluție care conține 11,7 g clorură de sodiu p.a. în aproximativ 400 ml apă distilată, apoi se completează cu apă balonul la semn ; 2. Pararozanilină, soluție apoasă 1%. Se poate păstra la rece în sticle brune timp de 2—3 luni. În momentul întrebuințării, se prepară o soluție prin diluarea a 4 ml soluție 1% cu 6 ml HCl concentrat și se completează la 100 ml cu apă distilată ; 3. Formaldehidă, soluție 0,4%. Se prepară prin diluarea 1 : 100 a soluției de formaldehidă 40% ; 4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 1,9677 g sulfit de sodiu p.a. într-un balon cotat de 1 000 ml, cu apă distilată. Conținutul în SO_2 a acestei soluții se verifică iodometric. 1 ml = 1 mg SO_2 ; 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 100. 1 ml = 10 μg SO_2.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 3 l aer cu un debit de 1 l/minut printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitorului se transvazează într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau 5 ml soluție, se adaugă 1 ml reactiv pararozanilină și 1 ml soluție formaldehidă, agitînd după fiecare adaos.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectofotometru, la $\lambda = 570$ nm în cuva de 1 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 5 și 25 μg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a SO_2, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg SO_2/m^3 aer:

$$\text{mg } SO_2/m^3 = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația SO_2, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

În cazul prezenței pulberilor în aer, aerul de cercetat este filtrat, înainte de a trece prin absorbitor, printr-un filtru de hîrtie sau printr-o alonjă umplută cu vată.

3. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Dioxidul de sulf colorează în roșu-cărămiziu pulberea de porțelan impregnată cu nitroprusiat de sodiu, clorură de zinc și urotropină.

Sensibilitatea metodei este de 0,2 mg SO_2/l aer.

Reacția este interferată de H_2S, NO_2 și ceața de H_2SO_4, care pot fi însă reținuți într-un cartuș filtrant.

Reactivi

1. Clorură de zinc, soluție 10% în HCl 0,01 N. 2. Nitroprusiat de sodiu. Se cîntăresc 2 g nitropruisat, se dizolvă în 10 ml apă distilată și se adaugă 2,4 ml glicerină diluată cu apă 1:1. Se prepară extemporaneu. 3. Urotropină, soluție 20%, preparată extemporaneu. 4. Pulbere de porțelan (vezi Amoniacul). 5. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g pulbere de porțelan cu 0,2 ml soluție de clorură de zinc, apoi cu 0,5 ml soluție de nitroprusiat de sodiu. Se usucă, omogenizînd pînă ce granulele nu mai aderă între ele. Pulberea uscată se umectează cu 0,5 ml soluție de urotropină, se omogenizează și se usucă. Pulberea se păstrează în fiole de sticlă închise și este stabilă 8 luni. 6. Tuburi indicatoare (vezi Oxidul de carbon). 7. Cartuș filtrant. Se folosește tubul descris la CO, în care se introduc succesiv, pe la capătul îngust clorură de calciu anhidră (în strat de 10 mm); pulbere de șamotă impregnată cu soluție de $CuSO_4$ (în strat de 50 mm), pentru

Scanned with OKEN Scanner

captarea H_2S și a vaporilor de apă; pulbere de șamotă impregnată cu difenilamină soluție 10% în alcool etilic (restul tubului) pentru captarea NO_2. Cînd stratul de $CaCl_2$, s-a umectat, cartușul este epuizat.

Modul de lucru

Se racordează un capăt al tubului indicator la analizorul de gaze universal UG-2, iar al doilea la capătul îngust al cartușului filtrant, apoi se aspiră aer. După 6 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe scara gradată în mg SO_2/l aer, corespunzînd concentrației de 0—0,20 mg/litru.

D. **Dozarea dioxidului de sulf în amestec cu alți toxici**

În unele situații apar ca noxe diferiți compuși ai sulfului care trebuie determinați separat, pentru a se cunoaște potențialul nociv al fiecăruia, cu atît mai mult cu cît fiecare dintre acești compuși are concentrație maximă admisă diferită.

1. *Dozarea dioxidului de sulf și a „ceței" de acid sulfuric aflați în amestec*

Se aspiră 20—30 l aer cu un debit de 0,25—0,40 l/minut printr-o soluție de $KClO_3$ 5%.

Soluția reține numai SO_2, oxidîndu-l la H_2SO_4, care se dozează nefelometric.

Ceața de H_2SO_4 nu este reținută de soluția de $KClO_3$ și este captată într-un absorbitor cu șicane (de exemplu, cu bule), conținînd 15 ml soluție apoasă de saponină. Se iau 3 ml din această soluție și se dozează ceața de H_2SO_4 nefelometric, ca la SO_2.

2. *Dozarea dioxidului de sulf și a hidrogenului sulfurat aflați în amestec*

Se aspiră aerul prin patru absorbitoare montate în serie. Primele două absorbitoare conțin cîte 10 ml soluție de $KClO_3$ 5%, iar ultimele două, cîte 10 ml amestec în părți egale de H_2O_2 3% și NH_4OH 2%.

Dioxidul de sulf este oxidat cantitativ la sulfat de către soluția de $KClO_3$, în timp ce H_2S nu este oxidat decît maximum 1—2%. Hidrogenul sulfurat care trece prin primele două absorbitoare este oxidat de H_2O_2 în mediu amoniacal pînă la sulfat, în ultimele două absorbitoare.

Se dozează separat sulfatul format în primele două absorbitoare și în ultimele două absorbitoare, calculîndu-se cantitatea de SO_2 și H_2S corespunzătoare.

3. *Dozarea dioxidului de sulf, hidrogenului sulfurat și a sulfurii de carbon aflați în amestec*

Se recoltează volume de aer egale pe reactivi de reținere diferiți. Toxicii reținuți selectiv pe reactivul corespunzător sînt reduși cu un curent de hidrogen în prezența negrului de platin (catalizator), obținîndu-se hidrogen sulfurat care este dozat.

Dioxidul de sulf este reținut printr-un filtru din granule de cărămidă refractară impregnată cu dioxid de mangan. Materialul de reținere se prepară impregnînd granulele de cărămidă refractară cu soluție de $KMnO_4$ și adăugînd apoi alcool etilic.

Hidrogenul sulfurat este reținut pe vată de azbest impregnată cu clorură de argint. Materialul de reținere se prepară îmbibînd vata de azbest într-o soluție de $AgNO_3$, după care este cufundată într-o soluție de HCl.

Scanned with OKEN Scanner

Sulfura de carbon este reţinută pe celit 22 impregnat cu o soluţie alcoolică de KOH 0,1 N.

După recoltare, fiecare tub de reţinere este introdus separat într-un aparat de hidrogenare prin care trece un curent de hidrogen cu un conţinut mic de acid clorhidric. Sulfura de carbon şi dioxidul de sulf sînt reduşi, în aceste condiţii, la hidrogen sulfurat care se dozează colorimetric prin formare de albastru de metilen.

II.1.7. AMONIACUL

A. Izolare

Amoniacul sub formă gazoasă (NH_3) sau de aerosoli (NH_4OH) se izolează din aer prin reţinere în soluţii absorbante.

B. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu sulfocianură ferică* este decolorată de amoniac. Soluţia se prepară din 9,6 ml sulfocianură de potasiu 40% şi 0,4 ml alaun feriamoniacal 10%. Sensibilitatea reacţiei este de 0,07 μg NH_3/litru aer. Reacţia nu este specifică, deoarece interferă vaporii acizi şi alcalini, şi aminele alifatice.

2. *Hîrtia roşie de turnesol* este albăstrită de amoniac (vapori).

3. *Hîrtia îmbibată cu sulfat de cupru* se colorează în albastru-azur în prezenţa amoniacului.

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Amoniacul formează cu tetraiodomercuriatul dipotasic, în soluţie alcalină (reactiv Nessler), oxiiodura amidomercurică galbenă-brună, colorimetrabilă :

$$2\ K_2[HgI_4] + NH_4OH + 3\ KOH = \left[O \begin{matrix} \diagup Hg \diagdown \\ \diagdown Hg \diagup \end{matrix} NH_2 \right] I^- + 7\ KI + 3\ H_2O$$

Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Metoda nu este specifică, fiind interferată de sărurile de amoniu, unele amine alifatice, anilina, unele aldehide etc.

Reactivi

1. Soluţie absorbantă : acid sulfuric 0,01 N sau apă bidistilată, proaspăt preparată ; 2. Reactiv Nessler. Se dizolvă 50 g IK în 50 ml apă bidistilată caldă. Se adaugă, agitînd continuu, soluţie saturată de clorură mercurică (25 g $HgCl_2$ în 50 ml apă bidistilată caldă), pînă ce precipitatul de iodură mercurică format nu se mai dizolvă. Se adaugă aproximativ 200 ml apă bidistilată şi se lasă în repaus 24 ore. Se separă supernatantul, se adaugă o soluţie de KOH (150 g KOH dizolvat în 300 ml apă bidistilată) şi se aduce amestecul la 1 000 ml cu apă bidistilată. Se adaugă încă 5 ml clorură mercurică şi se lasă în repaus 24 ore. Se decantează supernatantul şi se conservă

în sticle brune cu dop de cauciuc. 3. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,3143 g NH_4Cl p.a. (menținută în prealabil în exsicator cu $CaCl_2$) în 1 000 ml apă bidistilată (1 ml = 0,1 mg NH_3). Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 1 μg NH_3).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 0,5 litri aer, cu un debit de 0,1 l/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie conținînd cîte 2 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două microabsorbitoare cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește, prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml soluție absorbantă. Pentru dozare se iau, în altă eprubetă gradată, 5 ml soluție, se aduce volumul la 9 ml cu soluție absorbantă și se adaugă 1 ml reactiv Nessler.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

După 10 minute, se măsoară extincția la un spectrofotometru la λ = 440 nm în cuva de 1 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 2 și 10 μg NH_3, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația $CaNH_3$ în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg NH_3/m^3 aer :

$$\text{mg } NH_3/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația NH_3 în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Pentru a elimina interferența sărurilor de amoniu, se filtrează aerul înainte de a-l trece prin microabsorbitoare, printr-un filtru de hîrtie sau o alonjă umplută cu vată.

2. Dacă la adăugarea reactivului Nessler se formează un precipitat, se reia dozarea cu un alicot mai mic din probă.

2. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Amoniacul colorează în albastru-cenușiu pulberea de porțelan impregnată cu albastru de bromfenol.

Sensibilitatea metodei este de 0—0,4 mg NH_3/litru aer. Reacția este interferată de vaporii de acizi, baze și amine.

Reactivi

1. Albastru de bromfenol, soluție alcoolică 1% ; 2. Pulbere de porțelan. Se macină porțelan electrotehnic neglazurat, se spală de 3—4 ori cu apă (5 volume de apă la 1 volum pulbere) pentru îndepărtarea particulelor în

suspensie, se esorează și se usucă la 50—70°C ; pulberea se cerne, alegîndu-se fracțiunea cu diametrul granulelor de 0,25—0,32 mm ; 3. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g pulbere de porțelan cu 1 ml albastru de bromfenol și se omogenizează, la temperatura laboratorului, pînă ce mirosul de alcool a dispărut. Pulberea se păstrează în fiole de sticlă închise și este stabilă 8 luni; 4. Tuburi indicatoare (vezi Oxidul de carbon).

Modul de lucru

Se aspiră aer prin tub cu ajutorul analizorului de gaze universal UC-1. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului gradate în mg NH_3/l aer, corespunzînd următoarelor concentrații :

0—0,04 mg/l, la aspirarea a 250 ml aer, în decurs de 3 minute ;
0—0,40 mg/l, la aspirarea a 30 ml aer, în decurs de 2 minute.

II.1.8. OXIZII DE AZOT

A. Izolare

Oxizii de azot se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante.

B. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu iodură de potasiu și amidon* este colorată albastru de oxizii de azot (NO_2, N_2O_4, N_2O_5).

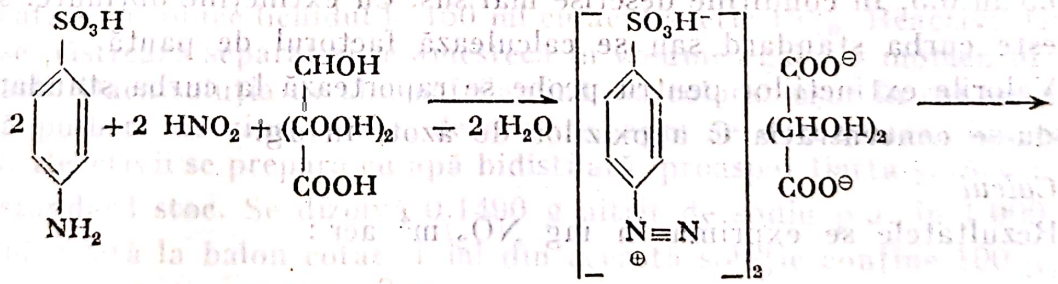
2. *Reactivul Griesz* dă, cu oxizii de azot, o culoare roz.

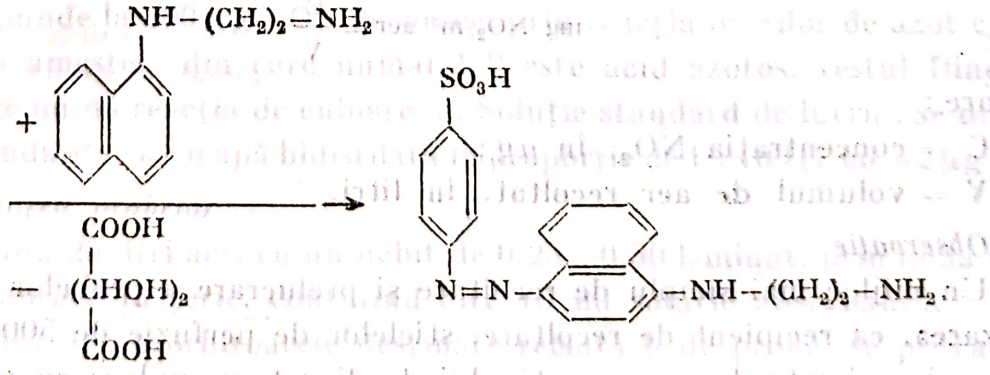
C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică (cu N_1-naftilendiamină)*

Principiu

Acidul azotos, rezultat din reacția oxizilor de azot cu apă, diazotează sulfanilamida formînd o sare de diazoniu, care se cuplează cu N_1-naftilendiamina (NED), rezultînd un compus roșu, colorimetrabil :





Sensibilitatea metodei este de 0,05 μg/ml. Reacția este specifică oxizilor de azot (NO_2, N_2O_4, N_2O_5) și nu este dată de acidul azotic.

Reactivi

1. Reactiv de diazotare-cuplare. Într-un mojar, se pulverizează și se omogenizează 1 g N_1-naftiletilendiamină cu 4 g sulfanilamidă și 95 g acid tartric. În stare umedă, reactivul se conservă timp îndelungat în flacoane brune, păstrate la întuneric. La întrebuințare, se dizolvă 1 g din amestecul de mai sus în 100 ml apă distilată. Soluția obținută trebuie să fie incoloră sau foarte slab roz; dacă soluția este colorată, reactivul trebuie refăcut. 2. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1499 g nitrit de sodiu ($NaNO_2$ p.a.) în 1 000 ml apă bidistilată la balon cotat. 1 ml din această soluție conține 100 μg NO_2, însă corespunde la 200 μg NO_2, deoarece, prin reacția oxizilor de azot cu apa, rezultă un amestec, din care numai 1/2 este acid azotos, restul fiind acid azotic, care nu dă reacția de culoare. 3. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1 : 400. 1 ml = 0,5 μg NO_2.

Recoltarea probelor

Aerul este recoltat în tonometre de 250—500 ml, calibrate exact, prin dislocuirea apei. Tonometrele bine închise se transportă în laborator.

Modul de lucru

Tonometrele cu probele de aer se răcesc la robinet sub curent de apă rece, pentru a contracta volumul gazului.

Se introduc, cu o pipetă racordată la tubul de intrare al tonometrului, 10 ml reactiv de diazotare-cuplare. Se rotește tonometrul 1—2 minute pentru a repartiza lichidul în strat subțire pe pereții lui, apoi se așază orizontal timp de 10 minute.

Se măsoară extincția la un spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 2 cm, în compensație cu un blanc al reactivilor.

Curba de standardizare se întocmește între 0,5 și 2,5 μg NO_2 prin puncte din 0,5 în 0,5, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația C a oxizilor de azot, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg NO_2/m^3 aer:

$$\text{mg } NO_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația NO_2, în μg;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

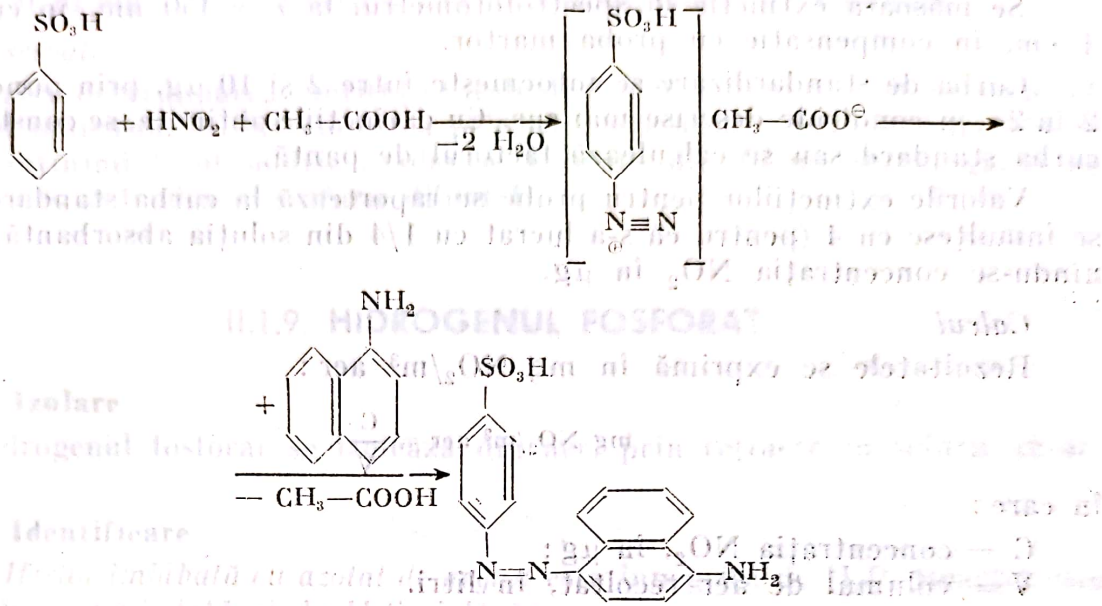
Un mijloc mai simplu de recoltare și prelucrare a probelor de aer este utilizarea, ca recipient de recoltare, sticlelor de perfuzie de 500 ml cu dop de cauciuc și introducerea reactivului de diazotare-cuplare cu o seringă de 10 ml prin înțeparea dopului.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Metoda spectrofotometrică (cu alfa-naftilamină)*

Principiu

Oxizii superiori de azot (NO_2, N_2O_4) dau, cu apa sau hidroxizii, cantități echimolare de HNO_2 și HNO_3. Acidul azotos diazotează acidul sulfanilic și apoi se cuplează cu alfa-naftilamina (componente ale reactivului Griesz-Ilosvay), dînd un compus diazo, roșu, colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferă oxidanții.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : hidroxid de sodiu 0,1 N. 2. Reactiv Griesz I. Se dizolvă 0,5 g acid sulfanilic în 150 ml acid acetic 15%. 3. Reactiv Griesz II. Se fierb, timp de 2 minute, 0,1 g alfa-naftilamină în 20 ml apă, se filtrează prin vată și se aduce lichidul la 150 ml cu acid acetic 15%. Reactivii Griesz I și II se păstrează separat și se amestecă în volume egale în momentul întrebuințării. Dacă soluția de alfa-naftilamină s-a colorat ușor în roz, se adaugă puțină pulbere de zinc pentru decolorare, apoi se decantează, îndepărtînd zincul. Reactivii se prepară cu apă bidistilată, proaspăt fiartă și răcită. 4. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1490 g nitrit de sodiu p.a. în 1 000 ml cu apă bidistilată la balon cotat. 1 ml din această soluție conține 100 μg NO_2, însă corespunde la 200 μg NO_2, deoarece, prin reacția oxizilor de azot cu apă, rezultă un amestec, din care numai 1/2 este acid azotos, restul fiind acid azotic, care nu dă reacția de culoare. 5. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 2 μg NO_2).

Recoltarea probelor

Se aspiră 20 litri aer, cu un debit de 0,25—0,50 l/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 20 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau 5 ml soluție, se adaugă 1 ml amestec de reactivi Griesz I și II, se agită și se lasă în repaus 10 minute.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 450$ nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 2 și 10 μg, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute, se construiește curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 4 (pentru că s-a lucrat cu 1/4 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația NO_2 în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg NO_2/m^3 aer:

$$\text{mg } NO_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația NO_2, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Pentru a exprima rezultatul în N_2O_5, se înmulțește rezultatul final cu 1,17 iar pentru a exprima în procente de volum, se înmulțește cu 0,025.

3. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Oxizii de azot colorează în verzui pulberea de silicagel impregnată cu difenilamină.

Reactivi

1. Acid clorhidric diluat (1—1). 2. Clorură de sodiu 20%. 3. Alcool etilic 96°. 4. Difenilamină $(C_6H_5)_2NH$, soluție alcoolică 0,5%. 5. Amestec de reactivi: 5 ml NaCl 20%, 1 ml apă, 1 ml alcool etilic și 3 ml soluție difenilamină. Se prepară extemporaneu. 6. Pulbere de silicagel: silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,160—0,315 mm se tratează cu HCl diluat (30 ml HCl la 10 g pulbere) și se fierbe 3 ore. Se spală, prin decantare, cu apă distilată caldă pînă la îndepărtarea HCl (reacție negativă pentru Cl^- cu soluție de $AgNO_3$ acidulată cu HNO_3), se esorează și se controlează din nou prezența Cl^-. Pulberea lipsită de Cl^- este uscată la 100°C și calcinată la 750°C timp de 2 ore. Se verifică dacă, sub acțiunea HCl, silicagelul astfel preparat nu se colorează în verzui, și, în caz afirmativ, se repetă operațiile de spălare. Pulberea albă se păstrează în fiole de sticlă, închise. 7. Pulberea indicatoare: se umectează uniform silicagelul cu apă și se usucă la 100°C. Se tratează 10 g pulbere uscată cu 2 ml amestec de reactivi, se omogenizează și se usucă la temperatura laboratorului. Pulberea se păstrează în fiole închise sub vid și este stabilă 8 luni. 8. Tuburi indicatoare (v. Oxidul de carbon).

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Se aspiră aer prin tub cu ajutorul analizorului de gaze universal UG-1. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului, gradate în mg NO_2/litru aer, corespunzînd concentrațiilor:

0—0,08 mg/l, la aspirarea a 250 ml aer în decurs de 6 minute;

0—0,20 mg/l, la aspirarea a 125 ml aer în decurs de 4 minute.

Observație

Pentru determinarea cantității totale de dioxid și oxid de azot, se atașează la tubul indicator, la extremitatea prin care pătrunde aerul, un microabsorbitor conținînd 1 ml soluție oxidantă, formată din 10 ml permanganat de potasiu 5% și 1 ml acid sulfuric diluat 1 : 1.

II.1.9. HIDROGENUL FOSFORAT

A. Izolare

Hidrogenul fosforat se izolează din aer, prin reținere în soluții absorbante.

B. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu azotat de argint* este înnegrită de H_3P. Reacția este nespecifică, fiind dată și de H_2S și H_3As.

2. *Hîrtia îmbibată cu reactivul Wilmet* (acid selenios, H_2SeO_3 8%) este înroșită de H_3P. Se poate, de asemenea, aspira aerul prin reactiv Wilmet, obținînd o culoare roșie. Reacția este negativă pentru H_3As și servește la diferențierea acestuia de H_3P.

3. *Hîrtia îmbibată în reactivul Weber* este colorată în galben-portocaliu de H_3P. Se îmbibă hîrtia cu soluție 5% de iodură mercurică și iodură de cadmiu, se usucă și se tratează cu o picătură de anhidridă acetică. În prezența H_3P, hîrtia se colorează în galben-portocaliu, iar în prezența H_3As, în brun, servind la diferențierea celor doi toxici. Se poate, de asemenea, trece aerul prin reactiv, obținînd colorațiile corespunzătoare. Reacția nu este interferată de H_2S.

C. Dozare

1. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Hidrogenul fosforat colorează în negru pulberea de silicagel impregantă cu azotat de argint.

Sensibilitatea metodei este de 20 μg H_3P/probă. Reacția este interferată de H_3Sb, H_3As și H_2S.

Reactivi

1. Azotat de argint, 1,5%. 2. Pulbere de silicagel. Silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,60—1,00 mm este fiert de cîteva ori cu apă, decantat, esorat și uscat la 85°C. 3. Pulbere indicatoare: se tratează 10 g silicagel și 13,3 ml $AgNO_3$, se lasă în contact 15 minute, se decantează și se usucă 3 ore la 90°C. 4. Tuburi indicatoare. Se folosesc tuburi de sticlă cu lungimea de 175 mm și diametrul interior de 5 mm. Se efilează ușor la flacără una

Scanned with OKEN Scanner

din extremități, astfel ca diametrul să ajungă la 2—3 mm. Se închide extremitatea îngustată cu vată de sticlă. Se umple tubul cu pulbere indicatoare și se închide cu vată de sticlă. Se păstrează la întuneric.

Modul de lucru

Se aspiră aer cu un debit de 1,4 l/minut. Cînd s-a atins acest debit, se înlocuiește tubul cu altul identic și se aspiră aer pînă la o lungime de strat colorat de 8 cm, notînd volumul de aer. Relația dintre lungimea stratului colorat și conținutul de H_3P în probă este următoarea :

lungimea stratului colorat (mm)	8	11	17	19	24	28	41
concentrația H_3P (mg/probă)	0,02	0,05	0,09	0,11	0,14	0,18	0,28

Concentrația H_3P în mg/litru se obține din relația :

$$\text{mg/litru aer} = \frac{a}{V}$$

în care :

a = concentrația de H_3P în probă, în mg ;
V = volumul de aer recoltat, în ml.

II.1.10. COMPUȘII ARSENULUI

A. **Izolare**

Compușii arsenului se izolează din elementele de mediu, precum și din produse biologice, medicamente, corpuri delicte etc.

a) *Izolare din aer* (v. Metoda spectrofotometrică, din aer).

b) *Izolare din produse biologice.* 1). *Urină, sînge, fanere* : (v. Metoda spectrofotometrică, din produse biologice) ; 2). *Organe* : în mersul general al analizei toxicologice, compușii de arsen se izolează după distrugerea substanței organice prin calcinare sau mineralizare umedă. În aceste operații este obligatorie evitarea formării de compuși de arsen volatili (As_2O_3, $AsCl_3$ etc.) sau de arsen elementar ; arsenul trebuie transformat în anion arsenic, cu o mare stabilitate.

B. **Determinarea rapidă din aer**

Hidrogenul arseniat, H_3As, se determină din aer cu :

a) *Hîrtii indicatoare* : azotat de argint (culoare neagră), reactiv Weber (culoare brună) (v. Hidrogenul fosforat), clorură mercurică (culoare galbenă pînă la neagră-brună). Aceste reacții sînt nespecifice, deoarece interferează H_2S, H_3P etc.

b) *Reacția Vasak-Sedicek* : se aspiră aerul printr-o soluție de dietilditiocarbamat de argint 0,5% în piridină, cînd se formează o colorație roz. Reacția este specifică și se pretează la dozare.

C. **Identificare din produse biologice sau alte produse**

1. *Reacția Bettendorf* : se tratează 1—2 ml din soluția de analizat cu 1 ml clorură stanoasă ($SnCl_2$ 10%) în acid clorhidric concentrat, cînd se formează o colorație sau precipitat brun de arsen elementar ;

$$2\ AsCl_5 + 5\ SnCl_2 \rightarrow 2\ As + 5\ SnCl_4$$

Scanned with OKEN Scanner

2. *Reacția Bougault* : se tratează 1 —2 ml soluție de analizat cu 2 ml reactiv Bougault și se menține 30 minute pe baia de apă la fierbere, cînd apare o coloratie sau precipitat brun de arsen elementar :

$$4\ H_3AsO_4 + 5\ NaH_2PO_2 \rightarrow 4\ As + 5\ NaH_2PO_4 + 6\ H_2O$$

Reacția este catalizată de urme de iod.

Reactiv Bougault : se dizolvă 10 g hipofosfit de sodiu, NaH_2PO_2, în 10 ml apă, se aduce la 200 ml cu acid clorhidric concentrat și de filtrează.

3. *Reacția cu molibdat de amoniu* : se încălzesc 1 —2 ml soluție de analizat — care conține AsO_4^{3-} — cu 0,5 ml soluție de molibdat de amoniu 1% în acid sulfuric 3 N și 1 ml acid azotic concentrat, cînd apare o coloratie sau precipitat galben de arsenomolibdat de amoniu. Dacă se adaugă cîteva picături dintr-un reducător — acid ascorbic 1%, sulfat de hidrazină 0,5% — se formează albastrul de molibden :

$$H_3AsO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21\ HNO_3 \rightarrow$$
$$\rightarrow (NH_4)_3H_4[As(Mo_2O_7)_6] + 21\ NH_4NO_3 + 10\ H_2O$$
$$\downarrow \text{reducere}$$
$$(MoO_2)_2(MoO_4)_3$$

Sensibilitatea reacției este de 0,5 μg/ml.

Compușii de As^{3+} trebuie să fie, în prealabil, oxidați la As^{5+}, după care se execută reacția de mai sus.

4. *Reacția Gutzeit* : se introduc într-o eprubetă 1 —2 ml soluție de analizat și se adaugă 2 —3 ml HCl concentrat și 2 —3 granule de zinc. Se astupă imediat cu un dop de vată îmbibată în soluție de acetat de plumb și apoi uscată — pentru reținerea H_2S — și se plasează deasupra dopului o hîrtie de filtru cu cîteva cristale de $AgNO_3$. Hidrogenul arseniat degajat colorează cristalele în galben-verzui, iar la umectare apare culoarea neagră

$$As_2O_3 + 6\ H_2 \rightarrow 2\ H_3As + 3\ H_2O$$
$$H_3As + 3\ AgNO_3 \rightarrow Ag_3As + HNO_3$$
$$Ag_3As + 3\ AgNO_3 \rightarrow Ag_3As \cdot 3\ AgNO_3$$
$$Ag_3As \cdot 3\ AgNO_3 + 3\ H_2O \rightarrow 6\ Ag + H_3AsO_3 + 3\ HNO_3$$

5. *Reacția Cribier* : se procedează în mod similar, însă se aplică, deasupra dopului de vată, o hîrtie impregnată cu $HgCl_2$ și uscată, cînd se formează pete de la galben la negru, în funcție de raportul dintre reactanți :

$$H_3As + HgCl_2 \xrightarrow[-HCl]{} AsH_2 \cdot HgCl \text{ galbenă}$$
$$AsH_2 \cdot HgCl + HgCl_2 \xrightarrow[-HCl]{} AsH \cdot (HgCl)_2 \text{ portocalie}$$
$$AsH(HgCl)_2 + HgCl_2 \xrightarrow[-HCl]{} As(HgCl)_3 \text{ brună}$$
$$\downarrow$$
$$As_2Hg_3 \text{ neagră}$$

Sensibilitatea reacției este de 10 μg arsen/ml.

Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică, din aer*

Principiu

Hidrogenul arseniat reacționează cu dietilditiocarbamatul de argint în piridină, cu formarea unui complex roșu-violaceu, colorimetrabil:

$$[(C_2H_5)_2N-\overset{\overset{S}{\|}}{C}-S-]_3As$$

În cazul oxizilor și sărurilor de arsen, se reduce arsenul sub formă de H_3As.

Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg As/ml. Metoda nu este specifică deoarece interferă H_2S și H_3Sb.

Reactivi

1. Acid clorhidric d = 1,19, lipsit de arsen. 2. Acid clorhidric 10%. 3. Iodură de potasiu 5%. Se prepară extemporaneu. 4. Clorură stanoasă 40% în acid clorhidric d = 1,19, la cald. Se prepară extemporaneu. 5. Zinc granule, lipsit de arsen. 6. Acetat de plumb 10%. 7. Piridină p.a. Pentru decolorarea piridinei se recomandă trecerea ei printr-o coloană de alumină activată cu diametrul de 25 mm și lungimea de 12,5 mm, cu o viteză de scurgere de 150 ml/oră. 8. Dietilditiocarbamat de argint. Se prepară astfel: într-un pahar conic de 500 ml se introduc 100 ml soluție de azotat de argint 0,1 N (aproximativ 1,7%), se adaugă, în porțiuni mici și agitînd, 100 ml soluție de dietilditiocarbamat de sodiu 0,1 N (aproximativ 2,25%). Precipitatul galben obținut se separă prin filtrare și se spală cu apă distilată pînă cînd apele de spălare nu mai dau reacția ionului argint. Precipitatul se usucă în exicator cu vid. Reactivul astfel preparat se păstrează în flacoane brune, bine închise, ferite de lumină. În timpul preparării, temperatura nu trebuie să depășească 20°C, pentru că există riscul descompunerii reactivului. 9. Dietilditiocarbamat de argint, soluție 0,5% în piridină. Se dizolvă 1 g dietilditiocarbamat de argint în 200 ml piridină. Se păstrează în sticlă brună, fiind stabilă, în aceste condiții, cîteva luni. 10. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1320 g anhidridă arsenioasă în 5 ml hidroxid de sodiu 10% (la nevoie se încălzește ușor pe baia de apă) și se aduce la 100 ml cu apă distilată. 1 ml = 1 mg arsen. 11. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 100. 1 ml = 10 μg arsen.

Recoltarea probelor

În cazul H_3As se aspiră aerul cu un debit de 0,5 litri/minut prin două absorbitoare montate în serie conținînd cîte 5 ml soluție de dietilditiocarbamat de argint 0,5% în piridină, pînă la colorarea soluției în roz. În cazul compușilor de arsen sub formă de pulberi — As_2O_3, Na_2AsO_4 etc. — se recoltează aerul cu un debit de 3 litri/minut într-un impinger conținînd 15 ml acid clorhidric 10%. Recoltarea se poate face și pe filtre cu porozitate fină (sinpor, milipore etc.), însă în acest caz este necesară operația de mineralizare.

În prezența H_2S se intercalează, înaintea recipientului de recoltare, un tub de sticlă cu hîrtie de filtru îmbibată cu acetat de plumb.

În afară de recipientele destinate recoltării de probe, se prevede încă unul, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin el, constituind proba martor.

Scanned with OKEN Scanner

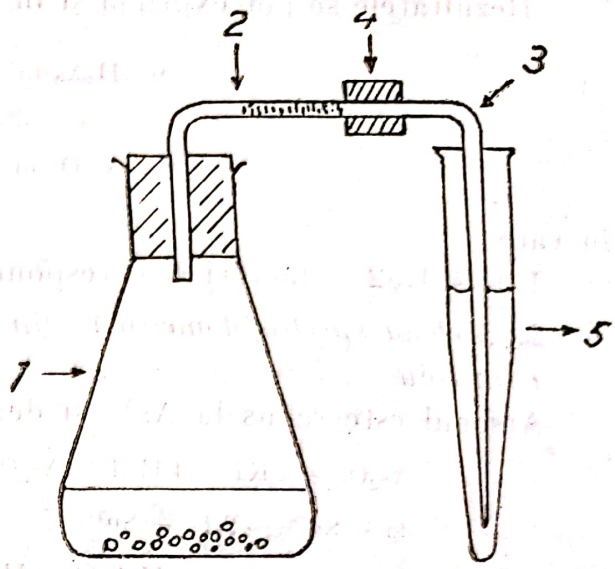


Fig. 23 — Instalație pentru reducerea arsenului la H_3As și antrenarea acestuia.

Modul de lucru

În cazul H_3As, proba se determină ca atare. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă martor, prelucrată ca și probele.

În cazul As^{5+}, se reduce proba la As^{3+} prin degajarea acestuia sub formă de H_3As. Se folosește o instalație simplă, compusă din : vasul de degajare (impingerul) (1), tubul de legătură (2) atașat printr-un manșon scurt (4) din cauciuc sau plastic de tubul de degajare (3), avînd un capăt efilat, vasul de captare (eprubeta) (5), în fundul căruia pătrunde capătul efilat al tubului de degajare. Ambele tuburi sînt din sticlă, îndoite în unghi drept. Între vasul de degajare și vasul de captare se intercalează un rulou de hîrtie de filtru umectată cu acetat de plumb (fig. 23).

Proba din impinger se completează la 20 ml cu acid clorhidric 10%, se adaugă 2 ml iodură de potasiu, 0,5 ml clorură stanoasă și se lasă 30 minute în repaus pentru reducerea As^{5+} la As^{3+}. În eprubeta de captare se introduc 5 ml soluție dietilditiocarbamat de argint. În impinger se adaugă 2 g zinc, se face imediat legătura cu eprubeta de captare și se lasă să se degajeze H_3As, barbotînd prin soluția de dietilditiocarbamat de argint timp de o oră.

Se trece apoi conținutul eprubetei de captare în cuva de 1 cm și se citește extincția la $\lambda = 530$ față de o probă martor prelucrată ca și probele.

Curba de standardizare se întocmește între 0 și 30 μg, prin puncte din 5 în 5 (se iau 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml soluție standard de lucru și se prelucrează în condițiile probelor). Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a arsenului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg As/m^3 aer :

$$\text{mg As/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația As, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele se pot exprima și în H_3As/m^3 aer sau As_2O_3/m^3 aer :

$$\text{mg } H_3As/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1{,}04$$

$$\text{mg } As_2O_3/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1{,}32$$

în care :

1,04 și 1,32 = factori de corespondență între As și H_3As, respectiv As_2O_3.

2. *Metoda spectrofotometrică, din produse biologice*

Principiu

Arsenul este redus la As^{3+} și degajat ca H_3As :

$$As_2O_5 + 4\,KI + 4\,HCl \rightarrow As_2O_3 + 2\,I_2 + 4\,KCl + 2\,H_2O$$

$$I_2 + Sn^{2+} \rightarrow 2\,I^- + Sn^{4+}$$

$$As_2O_3 + 6\,H_2 \rightarrow 2\,H_3As + 3\,H_2O$$

Hidrogenul arseniat este captat într-o soluție oxidantă, în care este fixat ca AsO_4^{3-}. Cu molibdatul de amoniu, AsO_4^{3-} formează un heteropolimolibdoarseniat, care este redus, de sulfatul de hidrazină, la albastru de molibden :

$$2\,H_3AsO_4 + 24(NH_4)_2MoO_4 + 21\,H_2SO_4 \rightarrow$$

$$2(NH_4)_3H_4[As(Mo_2O_7)_6] + 21(NH_4)_2SO_4 + 20\,H_2O$$

$$\downarrow \text{ reducere}$$

$$(MoO_2)_2(MoO_4)_3$$

Reactivi

1. Acid azotic d = 1,42. 2. Acid percloric 70%. 3. Acid clorhidric d = 1,19 (lipsit de arsen), diluat 1 : 10 (v/v). 4. Iodură de potasiu 5%. Se prepară extemporaneu. 5. Clorură stanoasă 40% în acid clorhidric d = 1,19. Se prepară extemporaneu. 6. Zinc (lipsit de arsen), granule. 7. Acid sulfuric, 6 N. 8. Molibdat de amoniu în acid sulfuric. Se dizolvă 1 mg molibdat de amoniu în 50 ml apă și se adaugă, răcind, 50 ml acid sulfuric soluție 6 N. 9. Sulfat de hidrazină 0,1% în apă. 10. Iod, soluție 0,016 N (0,2 g iod + 0,8 g KI la 100 ml apă). 11. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,4165 g arseniat de sodiu, $Na_2AsO_4 \cdot 7\,H_2O$ sau 0,2268 g arseniat de sodiu, Na_2HAsO_3 în 100 ml apă. 1 ml = 1 mg arsen. 12. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu acid clorhidric 10% în proporție de 1 : 100. 1 ml = 10 µg arsen.

Modul de lucru

Pregătirea probelor a). *Urină* : se recoltează urina din 24 ore. Într-un flacon Erlenmeyer se iau 200 ml urină și 10 ml acid azotic, se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește pe baia de nisip pînă ce volumul scade la 2—3 ml. După răcire, se adaugă 5 ml apă și 10 ml acid azotic și se continuă încălzirea pe baia de nisip pînă ce lichidul devine limpede, galben-deschis și nu mai emite vapori bruni. Dacă, înainte de aceasta, lichidul s-a evaporat, se mai adaugă cîțiva mililitri de apă și 2—3 ml acid azotic, apoi se continuă încălzirea, cu grijă ca să nu se carbonizeze. După răcire se adaugă, la lichidul final (cîțiva mililitri), 1 ml acid percloric și 2—3 ml apă și se continuă încălzirea flaconului acoperit cu sticla de ceas pînă la decolorarea completă. Se înlătură sticla de ceas și se

încălzește pînă la sec. Pentru îndepărtarea urmelor de acid percloric se reia reziduul cu 2—3 ml apă, de 4—5 ori, și se evaporă. Reziduul trebuie să fie cristalin și perfect alb. b). *Sînge* : se recoltează sînge pe fluorură de sodiu. Într-un flacon Erlenmeyer se iau 10 ml sînge și 10 ml acid azotic, se acoperă cu o sticlă de ceas și se continuă ca la urină. c). *Păr* : se taie păr cît mai aproape de rădăcină, avînd grijă ca lungimea firului să fie aproape aceeași. Se menține, pentru degresare, aproximativ 3 g păr, în eter etilic. Se filtrează, se spală cu apă și detergent, se clătește cu apă distilată și, în final, cu etanol. Se usucă la temperatura laboratorului între două hîrtii de filtru. După uscare se cîntăresc exact 2 g păr și se introduc într-un flacon Erlenmeyer, împreună cu 10 ml acid azotic, se acoperă cu o sticlă de ceas și se continuă ca la urină. d). *Unghii* : se procedează ca la păr, luîndu-se minimum 0,25 g unghii.

În toate aceste cazuri, se dizolvă reziduul obținut la mineralizare în 20 ml acid clorhidric 10%. Dacă nu s-a dizolvat complet, se filtrează printr-un filtru mic de vată de sticlă. Se lucrează cu toată proba, sau cu un alicot adus la 20 ml cu acid clorhidric 10%, la care se adaugă 4 ml iodură de potasiu și 0,5 ml clorură stanoasă, apoi se lasă 30 minute. Dacă în acest timp proba s-a îngălbenit (s-a degajat iod), înseamnă că reziduul mineral mai conține urme de oxidanți de la mineralizare și, în acest caz, se mai adaugă cîteva picături $SnCl_2$.

Separarea arsenului. Se trece cantitativ proba astfel pregătită în vasul de degajare (fig. 23). În tubul de legătură de amplasează, pe o lungime de 3 cm, vată — moderat îndesată — îmbibată cu acetat de plumb, stoarsă și uscată. În eprubeta de captare se iau 5 ml apă și 0,25 ml iod 0,016 N. În vasul de degajare se introduc aproximativ 2 g zinc granule, se face imediat legătura cu eprubeta de captare și se lasă să se degajeze H_3As, barbotînd prin soluția de iod, timp de o oră. Dacă soluția din eprubetă se decolorează, indicînd o concentrație mare de arsen, se reia determinarea cu o probă mai mică.

Dozarea arsenului. Se scoate eprubeta de captare și se adaugă 0,5 ml soluție molibdat și 0,25 ml soluție sulfat de hidrazină. Se menține 10 minute pe baia de apă la fierbere, se răcește și se completează volumul la 6 ml. Se citește extincția la spectrofotometru la $\lambda = 760$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor prelucrat în condițiile probei.

Curba de standardizare se întocmește între 5 și 15 μg arsen prin puncte din 2,5 în 2,5 (se iau 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 și 1,50 ml soluție standard de lucru și se prelucrează în condițiile probelor, inclusiv degajarea). Extincția probelor se raportează la curba de standardizare, obținîndu-se concentrația C a arsenului, în μg, în probă (dacă s-a lucrat cu toată proba).

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg As la urina din 24 ore, sau la 100 ml sînge, sau la 100 g fanere (păr și unghii):

$$\mu g\ As/urina\ 24\ ore = \frac{C}{V} \cdot V_{24}$$

$$\mu g\ As/100\ ml\ sînge = \frac{C}{V} \cdot 100$$

$$\mu g\ As/100\ g\ fanere = \frac{C}{G} \cdot 100$$

în care :

C = concentrația As în μg ;
V = volumul de urină (sînge) luat în lucru, în ml ;
V_{24} = volumul de urină din 24 ore, în ml ;
G = cantitatea de fanere luată în lucru, în g.

Observații

1. Oxidarea H_3As la H_3AsO_4 se poate realiza și prin captarea sa în vasul de captare în care se găsesc 1 ml $HgCl_2$ soluție 40%, 0,5 ml H_2SO_4 soluție 6 N, 0,2 ml $KMnO_4$ soluție 0,1%. După 45 minute de degajare, se adaugă 5 ml reactiv molibdat-hidrazină. Culoarea permanganatului trebuie să dispară imediat. Se fierbe eprubeta pe baia de apă 15 minute, se răcește, se aduce soluția de la 10 ml cu apă și se citește extincția la 760 nm, în condițiile de mai sus.

Reactiv molibdat-hidrazină : soluția (a) : molibdat de amoniu 1 g, apă distilată 50 ml, acid sulfuric soluție 6 N, 50 ml ; soluția (b) : sulfat de hidrazină 0,15% soluție apoasă. La întrebuințare se amestecă 1 volum soluție (a), 1 volum soluție (b) și 8 volume apă distilată.

2. Dozarea se poate realiza și prin complexul roșu-violaceu format de dietilditiocarbamatul de argint. Reziduul de la mineralizare se reia de 3 ori cu cîte 5 ml HCl 10%, se filtrează în vasul de degajare și se adaugă 5 ml HCl conc, 2 ml KI 15%, 1 ml $SnCl_2$ 40%. ($SnCl_2$ în soluție clorhidrică se separă sub formă de precipitat amorf brun-negru ; excesul de HCl este necesar pentru formarea $AsCl_3$, care cu hidrogenul în stare născîndă trece în H_3As volatil.) Soluția astfel pregătită se lasă 30 minute pentru ca reducerea să fie completă. În vasul de degajare se adaugă 3 g zinc granule și se face imediat legătura cu vasul de captare, care conține 4 ml soluție de dietilditiocarbamat de argint 0,5% în piridină (v. Metoda spectrofotometrică din aer). După 30 minute se citește extincția la $\lambda = 530$ nm, în condițiile descrise la dozarea din aer.

Interpretarea rezultatelor

Valorile normale sînt : urină : pînă la 100 μg As/24 ore sau 15—60 μg As/litru ; sînge, pînă la 10 μg As/100 ml, păr, 6—100 μg As/100 g. Este de observat că în păr concentrațiile de arsen cresc mult în porțiunea de fir corespunzătoare perioadei de expunere, ceea ce constituie un indice semnificativ pentru diagnosticul retrospectiv al acesteia. De asemenea, creșterea concentrațiilor sanguine și urinare denotă expunerea organismului la un mediu poluat cu arsen — acesta fiind un toxic cumulativ — sau o intoxicație acută cu compușii acestui element.

II.1.11. ACETILENA

A. Identificare

1. *Hîrtia îmbibată cu reactiv cupros* se colorează în roșu-brun.

Reactiv cupros : se dizolvă 1 g $Cu_2Cl_2 \cdot 2\,H_2O$ în 75 ml apă distilată proaspăt fiartă și răcită și se adaugă 25 ml amoniac 10%. Înaintea utilizării, hîrtia îmbibată cu acest reactiv este tratată cu o soluție concentrată de hidroxilamină pînă la decolorare.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Reacția cu iodomercuriat de potasiu* : se barbotează aerul prin acest reactiv, cînd se formează un precipitat alb.

Iodomercuriat de potasiu : se dizolvă 25 g iodură de mercur și 30 g iodură de potasiu în 100 ml apă distilată și se alcalinizează înaintea întrebuințării.

B. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (tehnica Popa-Armășescu)*

Principiu

Acetilena formează cu ionul cupros un precipitat roșu-brun de acetilură cuproasă, care se separă prin centrifugare, apoi se distruge prin oxidare cu acid azotic. Ionul cupric este dozat cu piridină-sulfocianură (metoda Spacu), cînd se obține o colorație sau un precipitat verde deschis, solubil în cloroform, colorimetrabil :

$$HC{\equiv}CH + Cu_2Cl_2 \rightarrow CuC{\equiv}CCu + 2\,HCl$$

$$2\,HCl + 2\,NH_4OH \rightarrow 2\,NH_4Cl + 2\,H_2O$$

$$3\,CuC{\equiv}CCu + 14\,HNO_3 \rightarrow 6\,Cu(NO_3)_2 + 2\,NO + 4\,H_2O + 3\,C_2H_2$$

$$Cu(NO_3)_2 + Py + 2\,KSCN \rightarrow [CuPy_2](SCN)_2 + 2\,KNO_3$$

Reactivi

1. Soluție absorbantă. Se dizolvă 1 g $Cu_2Cl_2 \cdot 2H_2O$ în 75 ml apă distilată, proaspăt fiartă și răcită, apoi se adaugă 25 ml amoniac 10%. Înainte de întrebuințare, reactivul se decolorează cu o soluție concentrată de clorhidrat de hidroxilamină. 2. Acid azotic, d = 1,42. 3. Piridină proaspăt distilată, incoloră. 4. Sulfocianură de potasiu 20%. 5. Acid cromic 20%. 6. Cloroform p.a. 7. Soluție standard stoc. Se dizolvă 1,9180 g $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ p.a. în 100 ml apă distilată. 1 ml = 1 mg acetilenă. 8. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1 : 10. 1 ml = 100 μg acetilenă.

Recoltarea probelor

Se montează în serie trei eprubete (1, 2, 3), transformate în vase spălătoare prin închiderea lor cu dopuri de cauciuc, prevăzute cu două tuburi. În eprubeta 1 se introduc 2 ml acid cromic 20% pentru a oxida H_2S, H_3P și H_3As, care pot impurifica acetilenă. În eprubetele 2 și 3 se introduc cîte 4 ml soluție absorbantă, pentru reținerea acetilenei sub formă de acetilură cuproasă, precipitat roșu-brun.

Pentru a evita erorile produse de dizolvarea acetilenei în apă (solubilitate 1 : 1), se absoarbe inițial aerul numai prin eprubeta 1 (cu acid cromic) pînă la saturarea cu acetilenă, și numai după aceea se montează în circuit și eprubetele 2 și 3 (cu soluție absorbantă) și se începe măsurarea volumului de aer aspirat. Se aspiră aer, pînă cînd în eprubeta 2 apare un precipitat abundent, iar în eprubeta 3, soluția este limpede.

Modul de lucru

Se centrifughează eprubeta 2 (cu precipitatul de acetilură de cupru), se spală precipitatul de trei ori cu cîte 1 ml apă distilată, se centrifughează de fiecare dată, îndepărtînd apa, pentru eliminarea ionilor de cupru. Se descompune acetilură cuproasă cu 2—3 picături de HNO_3 concentrat, cînd Cu^+ trece în Cu^{++}. Se aduce soluția la volum final de 5 ml. Se iau din această soluție 0,5—2,5 ml (în funcție de concentrația acetilenei), se completează la 3 ml cu

Scanned with OKEN Scanner

apă, apoi se adaugă succesiv : 5 —10 picături de piridină (pentru a obține culoarea albastră), 1 ml KSCN (cînd se formează precipitatul verde) și 2 ml cloroform (sau mai mult, pînă la dizolvarea precipitatului). Se citește extincția fazei cloroformice la spectrofotometru, la $\lambda = 714$ nm, în cuva de 1 cm, cu capac, față de un blanc al reactivilor.

Curba de standardizare se întocmește între 10 și 110 μg C_2H_2, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 10 (dacă s-a lucrat cu 0,5 ml soluție), cu 2 (dacă s-a lucrat cu 2,5 ml soluție etc.), obținîndu-se concentrația C a acetilenei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg C_2H_2/m^3 aer :

$$\text{mg } C_2H_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația acetilenei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. *Metoda colorimetrică liniară*

Principiu

Acetilena colorează în brun-castaniu pulberea de silicagel impregnată cu iodat de potasiu în acid sulfuric.

Sensibilitatea metodei este de 0,14 mg C_2H_2/litru aer, dacă proba este de 265 ml aer. Reacția este interferată de vaporii de apă, H_3P, NH_3 și acetonă, care pot fi însă reținuți într-un cartuș filtrant.

Reactivi

1. Acid sulfuric d = 1,84. 2. Iodat de potasiu în acid sulfuric (0,24 g KIO_3 în 12 ml H_2SO_4 d = 1,84). 3. Pulbere de silicagel. Silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,16 —0,25 mm, este fiert de cîteva ori cu apă, decantat, esorat și uscat la 85°C. 4. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g silicagel cu 8 ml iodat de potasiu, se omogenizează și se usucă 90 minute la 200 —210°C. Se răcește în exsicator pe acid sulfuric și se trece în fiole, închizîndu-le sub vid. Pulberea este stabilă 2 ani. 5. Tuburi indicatoare (v. Oxidul de carbon). 6. Cartuș filtrant. Se folosește un tub de sticlă cu lungimea de 70 mm și diametrul de 10 ml, avînd forma descrisă la CO. Se umple primul compartiment cu silicagel impregnat cu soluție de anhidridă cromică și următoarele compartimente cu granule de clorură de calciu anhidră. Cînd clorura de calciu s-a umezit, cartușul este saturat cu vapori de apă, iar cînd anhidrida cromică și-a modificat culoarea, cartușul este epuizat cu ceilalți interferenți.

Modul de lucru

Se racordează un capăt al tubului indicator la analizorul de gaze universal UG-2, iar al doilea, la capătul îngust al cartușului filtrant, apoi se aspiră aer. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului gradate în mg acetilenă/litru aer, corespunzînd concentrațiilor :

0 —1,4 mg/l, la aspirarea a 265 ml aer, în decurs de 8 minute ;
0 —6 mg/l, la aspirarea a 60 ml aer, în decurs de 5 minute.

Scanned with OKEN Scanner

II.1.12. OXIDUL DE CARBON

A. Izolare

Oxidul de carbon se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante și — dintre produsele biologice, — numai din sînge, unde se unește cu hemoglobina cu formare de carboxihemoglobină.

B. Identificare rapidă din aer

Se lasă în contact aerul cu hîrtii indicatoare, sau, preferabil, se aspiră aerul prin pîlnia Palmer (sau alte dispozitive similare) pe care sînt fixate hîrtiile indicatoare.

1. *Hîrtia îmbibată cu clorură paladoasă și acetat de sodiu* se înnegrește, deoarece CO reduce $PdCl_2$ la Pd metalic. Acetatul de sodiu servește la tamponarea HCl rezultat :

$$CO + PdCl_2 + H_2O = CO_2 + Pd + 2\,HCl$$

2. *Hîrtia îmbibată cu anhidridă iodică și amidon* se înălbăstrește, deoarece CO reduce I_2O_5 la I_2 :

$$5\,CO + I_2O_5 = 5\,CO_2 + I_2$$

Ambele reacții sînt nespecifice, fiind date și de alți reducători.

C. Identificare din sînge

Sîngele conținînd CO este colorat în roșu deschis. La adaos de precipitanți, sîngele normal formează un precipitat cenușiu-brun, iar sîngele cu CO, un precipitat roz-roșietic. Se folosesc mai frecvent reacțiile :

1. *Reacția Lehman* : peste un amestec de 5 ml ferocianură de potasiu 2% și 1 ml acid acetic 1/3, se adaugă 10 ml sînge diluat 1/5, se agită și se lasă să se depună. În cazul sîngelui cu CO se observă un precipitat roșietic, iar a sîngelui normal, un precipitat brun.

2. *Reacția Sayers-Yant* : la 1 volum sînge diluat 5% se adaugă 1 volum reactiv preparat din 2 g tanin și 2 g pirogalol la 100 ml apă. Se agită și, după 15 minute, dacă sîngele conține CO, se observă un precipitat roșietic, care se compară cu precipitatul cenușiu dat de un sînge martor, tratat identic.

Ambele reacții sînt sensibile numai la concentrații peste 2—5% COHb.

3. *Reacția Wolff* (v. Dozare).

4. *Metoda spectroscopică.* Oxihemoglobina și carboxihemoglobina prezintă spectre de absorbție în domeniul vizibil constituite, fiecare, din cîte două benzi asemănătoare, însă ușor deplasate una față de cealaltă. Prin tratare cu un reducător, HbO_2 este redusă la Hb, fapt constatat prin dispariția celor două benzi caracteristice ale sale și apariția benzii de absorbție a Hb (banda lui Stokes). În aceleași condiții, HbCO își păstrează cele două benzi.

Se procedează astfel : se diluează sîngele cu apă distilată în proporție de 1 : 100, se filtrează și se divide filtratul în două porțiuni, care se examinează la spectroscop.

Prima porțiune de filtrat, examinată ca atare, prezintă un spectru caracteristic pentru *oxihemoglobină*, și anume, două benzi întunecate : prima bandă, mai îngustă, în zona galbenă, în dreptul liniei D a lui Frauenhofer, cu maxima

la 578 nm și limitele 587—568 nm, cealaltă, mai lată, în zona verde, în dreptul liniei E, cu maxima la 542 nm și limitele 552—527 nm.

A doua porțiune de filtrat este tratată cu cîteva picături de polisulfură de amoniu 10% sau cîteva cristale de hidrosulfit de sodiu, și, după cîteva minute, examinată la spectroscop. Apare spectrul caracteristic al *hemoglobinei reduse* — deoarece HbO_2 a cedat oxigenul reducătorului — format dintr-o singură bandă întunecată (banda lui Stokes), ale cărei margini nu sînt perfect delimitate, amplasată între liniile D și E, cu maxima la 555 nm și limitele 565—545 nm.

Dacă sîngele conține CO se observă la spectroscop două benzi asemănătoare celor ale HbO_2, însă ușor deplasate în domeniul verde, cu maximele la 570 nm și 539 nm. La tratare cu un reducător, aceste două benzi nu dispar pentru a forma banda lui Stokes și această comportare este caracteristică *carboxihemoglobinei*.

Ceilalți derivați ai hemoglobinei — methemoglobina, hematina alcalină și acidă, hemocromogenul, hematoporfirina — produși pe diferite căi, prezintă de asemenea, aspecte caracteristice (fig. 24).

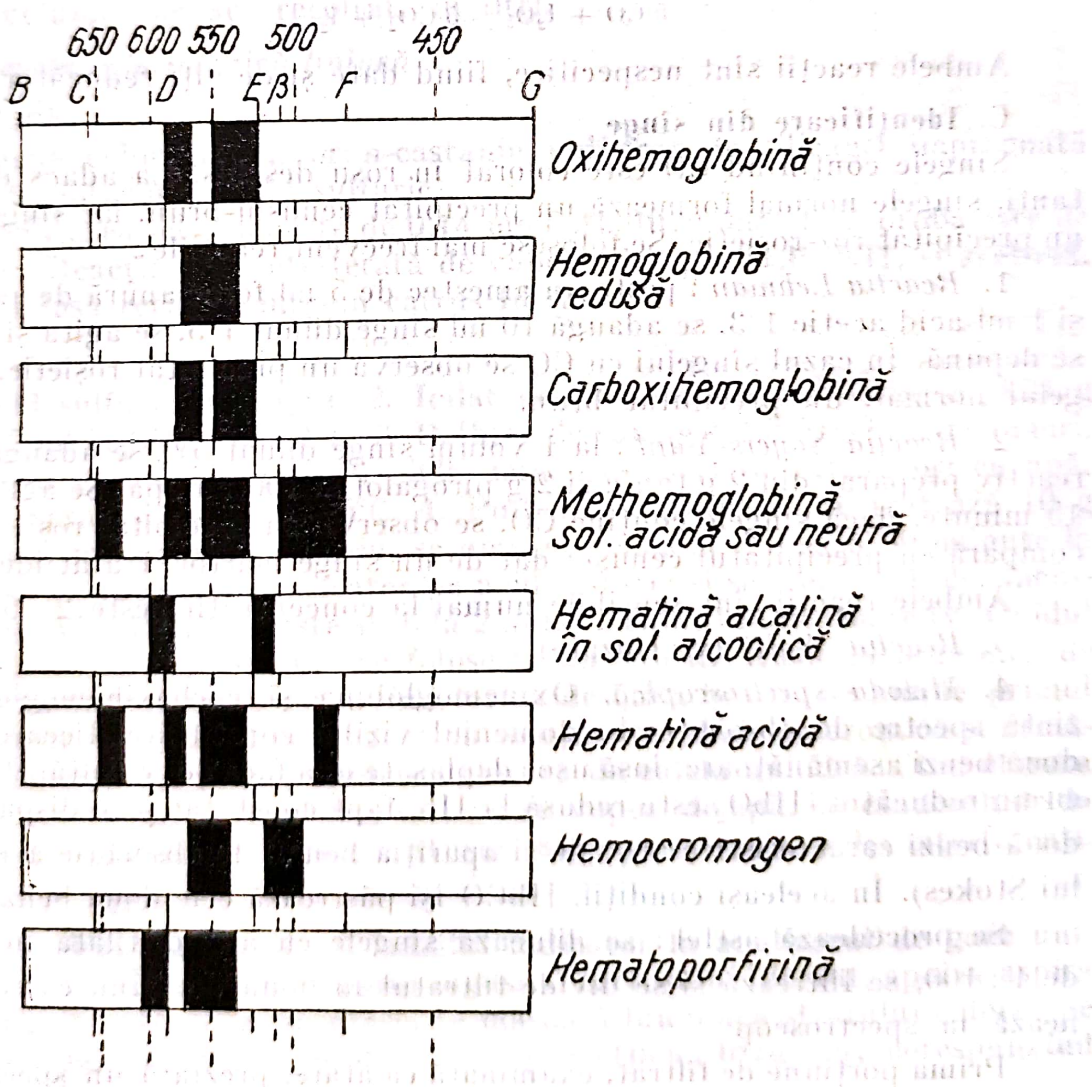


Fig. 24 — Spectre de absorbție ale HbO_2, Hb, CoHb, MetHb și ale derivaților lor.

Oxihemoglobina, hemoglobina și carboxihemoglobina pot fi decelate numai în sîngele proaspăt, întrucît, dacă sîngele este putrefiat, se formează din Hb, hematină alcalină (sub acțiunea NH_4) care trece în hemocromogen (sub acțiunea H_2S). Spectrul hemocromogenului este asemănător celui al oxihemoglobinei, avînd tot o bandă îngustă în zona galbenă și una lată în zona verde, însă poziția lor este ușor deplasată spre zona verde (dreapta).

Spre a diferenția aceste benzi de absorbție, diferite numai prin pozițiile lor, se utilizează spectroscoape cu șurub micrometric, cu ajutorul căruia se poate stabili cu precizie poziția benzilor. Aceasta este necesar, deoarece numai sîngele saturat cu CO prezintă spectrul său caracteristic, iar în sîngele din intoxicațiile curente cu CO sau în sîngele putrefiat, apare, pe lîngă spectrul HbCO, și spectrul hemocromogenului : prima bandă este mai extinsă, fiind formată atît din banda HbCO, cît și din banda hemocromogenului.

Metoda spectroscopică, puțin sensibilă dar foarte specifică, este indicată pentru identificarea sigură a CO, însă cu condiția ca sîngele să nu fie putrefiat și să conțină minimum 10% COHb.

D. Dozarea oxidului de carbon

1. *Metoda spectrofotometrică cu clorură paladoasă, din aer*

Principiu

Oxidul de carbon reduce clorura paladoasă la paladiu metalic. Excesul de $PdCl_2$ formează cu IK în exces, tetraiodopaladat dipotasic, de culoare roșie-brună, colorimetrabil. Cantitatea de CO intrat în reacție se determină prin diferență :

$$CO + PdCl_2 + H_2O = CO_2 + Pd + 2\,HCl$$

$$PdCl_2 + 4\,KI = K_2[PdI_4] + 2\,KCl$$

Sensibilitatea metodei este de 1 mg/ml. Metoda nu este specifică, deoarece interferă toți reducătorii din aer (H_2S, SO_2, aldehide etc.).

Reactivi

1. Clorură paladoasă soluție 0,1%. Se usucă clorura paladoasă la 105°C și se lasă la întuneric, în exicator, pînă a doua zi. La 0,1000 g $PdCl_2$ sic. se adaugă 30 ml apă și 0,5 ml HCl concentrat și se încălzește pe baia de apă pînă la dizolvarea completă, apoi se aduce la 100 ml cu apă (1 ml = 1 mg $PdCl_2$). Soluția se păstrează în flacon brun, la rece. 2. Iodură de potasiu, soluție 20%. Se prepară extemporaneu.

Recoltarea probelor

Aerul de analizat se recoltează în recipiente de sticlă cu capacitate bine determinată, prevăzute cu dopuri de cauciuc în care se fixează un tub de sticlă care ajunge pînă la fundul recipientului și o pîlnie cu robinet pe tijă, la nivelul inferior al dopului. Recipientul se umple cu apă. La locul recoltării se golește apa, prin pîlnia cu robinet, iar aerul pătrunde în recipient prin tubul cel lung. Dacă se presupune că aerul de analizat ar conține, pe lîngă CO, și alte gaze reducătoare, se atașează, la capătul tubului prin care intră aerul, două absorbitoare montate în serie, umplute cu perle de sticlă și conținînd, primul,

Scanned with OKEN Scanner

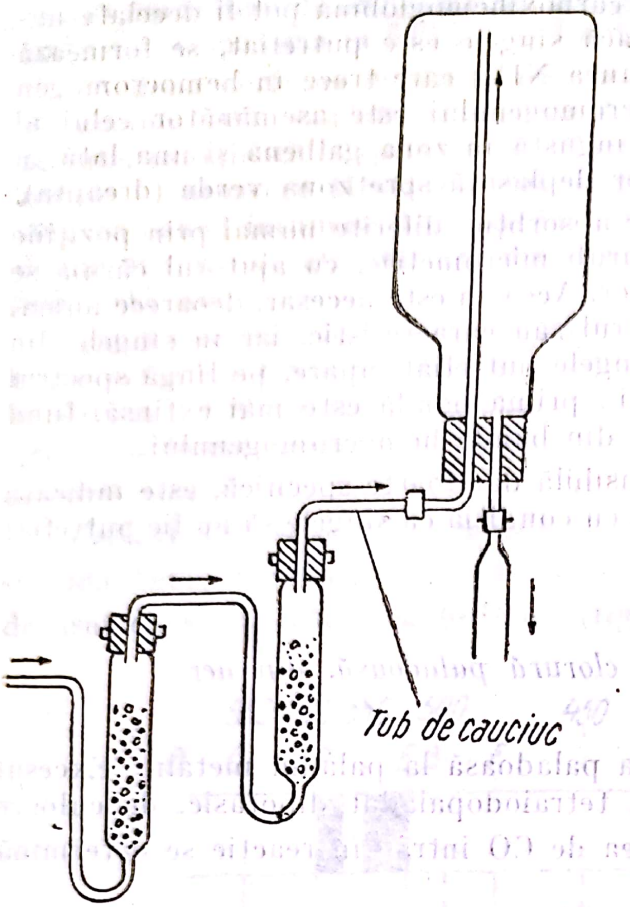


Fig. 25 — Instalație pentru recoltarea CO din aer prin dislocuire de apă, în cazul prezenței altor reducători.

20 ml NaOH 10%, iar al doilea, 20 ml acetat de plumb. Volumul minim de aer pentru o probă este de 1 litru (fig. 25).

Modul de lucru

Recipientul cu aerul recoltat se răcește la jet de apă sau la gheață, pentru a se contracta aerul din interior, permițînd intrarea reactivilor. Se introduc, prin pîlnie, 2 ml $PdCl_2$ exact măsurați, apoi se spală pîlnia de trei ori cu cîte 1—2 ml apă, care se introduc tot în recipient. Adăugarea soluției de $PdCl_2$ și a apei se face cu grijă, pentru a nu introduce aer din exterior, de aceea se lasă în pîlnie puțină soluție sau apă, ca supapă de siguranță.

Recipientul cu reactiv se lasă la întuneric 24 ore (sau minimum 4 ore), agitînd periodic. Dacă s-a format o oglindă de Pd metalic și soluția este complet decolorată, datorită reducerii complete a $PdCl_2$, se mai adaugă 1 ml $PdCl_2$ și se lasă din nou în repaus 4 ore.

Se scoate dopul recipientului și se filtrează conținutul într-un balon cotat de 100 ml. Se spală recipientul și pîlnia cu 50 ml apă, care se aduc cantitativ în balonul cotat. Se adaugă 15 ml IK 20% prin filtru, se spală filtrul cu apă și se aduce la semn.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 1 cm, față de apă distilată.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 3 mg $PdCl_2$ prin puncte din 0,5 în 0,5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a $PdCl_2$ nereacționată (în exces), în mg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CO/m³ aer :

$$\text{mg CO/m}^3 \text{ aer} = \frac{(N-C)\cdot 0{,}157\cdot 1\,000}{V}$$

în care :

C = concentrația $PdCl_2$ nereacționată (în exces), în mg ;
N = ml $PdCl_2$ adăugați în total (1 ml = 1 mg) ;
V = volumul de aer recoltat (capacitatea recipientului), în litri ;
0,157 = factor de corespondență între 1 mg $PdCl_2$ sic. și 1 mg CO.

Observații

1. Recoltarea probelor se poate efectua și prin aspirarea aerului într-un recipient vidat, care conține o fiolă de 2 ml $PdCl_2$ 0,1%. După recoltare, fiola se sparge prin agitarea recipientului, punîndu-se în contact reactivul cu CO din aerul recoltat, apoi se continuă ca mai sus. 2. Dacă nu se elimină substanțele interferente (H_2S, SO_2 etc.), rezultatul se dă în mg substanțe reducătoare exprimate în CO.

2. *Metoda spectrofotometrică cu acid fosfowolframomolibdenic (tehnica Borș-Ioanid), din aer*

Principiu

Oxidul de carbon reduce clorura paladoasă la paladiu metalic care, la rîndul său, reduce acidul fosfowolframomolibdenic (reactiv Folin-Ciocîlteu) la albastru de molibden, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 60 μg/10 ml. Metoda nu este specifică, deoarece interferă H_2S, SO_2 care însă pot fi reținuți prin trecerea aerului — în această variantă — printr-o soluție alcalină de arsenit. Interferă, de asemenea, hidrogenul, a cărui îndepărtare este însă dificilă.

Reactivi

1. Clorură paladoasă soluție 0,1% (v. metoda precedentă). 2. Reactiv Folin-Ciocîlteu (v. Fenolul). 3. Soluție standard stoc (standard artificial). Se dizolvă 0,8400 g sulfat feroamoniacal $FeSO_4\cdot(NH_4)_2SO_4\cdot 6\,H_2O$ (sare Mohr) în 50 ml apă, se adaugă 5 picături de acid sulfuric concentrat și se aduce la 100 ml cu apă (1 ml = 300 μg CO). 4. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1 : 10 (1 ml = 30 μg CO).

Recoltarea probelor

Aerul de analizat este recoltat în recipiente de sticlă umplute cu apă, care se golesc la locul recoltării (fig. 25). Pentru reținerea interferenților, se montează, la capătul tubului prin care intră aerul, un singur absorbitor umplut cu perle de sticlă și conținînd 10 ml arsenit de sodiu 1% în hidroxid de sodiu 10%.

Modul de lucru

Se introduc în pîlnia recipientului de recoltare, cu precauțiunile arătate la metoda precedentă, un amestec format din 3 ml clorură paladoasă 0,1% și 1 ml reactiv Folin-Ciocîlteu. Se agită prin rotire recipientul cu reactivii, astfel încît întreaga cantitate de aer să vină în contact cu aceștia. După 24 ore de menținere la întuneric, se golește conținutul recipientului într-o

eprubetă gradată și se completează volumul la 10 ml cu apele de spălare ale recipientului. Dacă se observă un depozit negru de Pd metalic, înseamnă că concentrația CO este prea mare și se reia determinarea, recoltînd un volum mai mic de aer. Eprubeta se menține 30 minute într-o baie de apă la 80°C, apoi se răcește. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 670$ nm, în cuva de 1 cm, față de apă distilată.

Curba de standardizare se întocmește între 0 și 60 μg CO, prin puncte din 15 în 15. Se iau, în eprubete gradate, 0 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 și 2,0 ml soluție standard de lucru, se aduc la 2 ml cu apă, apoi se adaugă 3 ml $PdCl_2$ și 1 ml reactiv Folin-Ciocîlteu. Se astupă eprubetele și se lasă o oră în repaus, agitînd periodic. Se aduce volumul la 10 ml cu apă, se mențin 30 minute la 80°C și se citesc extincțiile în condițiile probelor. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a CO, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CO/m³ aer :

$$\text{mg CO/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația CO, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

1. Recoltarea probelor se poate efectua și prin aspirarea aerului în tonometre cu robinete la capete, vidate în prealabil sau chiar în biurete cu gaz.

3. *Metoda colorimetrică (cu analizorul UG-2), din aer*

Principiu

Oxidul de carbon colorează în brun pulberea de silicagel impregnată cu iodat de potasiu în acid sulfuric. Sensibilitatea metodei este de 15 μg CO/litru aer. Reacția este interferată de vapori de apă, hidrocarburi alifatice (metan, propan, butan, acetilenă, etenă), benzen și omologi, benzină, dicloretan, metanol, etanol, formaldehidă, acetonă, acid formic, sulfură de carbon, hidrogen sulfurat, dioxid de sulf, oxizi de azot, clor, hidrogen, care pot fi însă reținuți într-un cartuș filtrant. De asemenea, carbonilii metalici interferă, dar nu sînt reținuți în cartuș.

Reactivi

1. Acid sulfuric d = 1,84. 2. Iodat de potasiu. Se dizolvă 0,16 g KIO_3 în 100 ml acid sulfuric d = 1,84. 3. Pulbere de silicagel : silicagel cu pori mari, cu diametrul granulelor de 0,125—0,160 mm, este fiert de cîteva ori cu apă, decantat, esorat și uscat la 85°C. 4. Pulbere indicatoare : se tratează 10 g silicagel cu 6 ml iodat de potasiu, se omogenizează și se usucă o oră la 260°C. Se răcește în exsicator pe H_2SO_4 și se trece în fiole, închizîndu-le sub vid. Pulberea este stabilă 15 luni. 5. Tuburi indicatoare. Se folosesc tuburi de sticlă cu lungimea de 90 mm și diametrul interior de 2,5 mm. Se introduce în tub o tijă de oțel de 80 mm. La capătul liber al tubului se presează, pînă ce ajunge în contact cu tija, un strat de vată hidrofilă, peste care se plasează o sită de cupru. Se scoate tija și se introduce, tasînd ușor, pulberea indicatoare,

Scanned with OKEN Scanner

realizînd o lungime de strat de 67—70 mm. Neasigurarea unei tasări uniforme conduce la imposibilitatea delimitării nete a stratului colorat, la întrebuințare. Peste pulbere, se plasează un strat de vată și o sită de cupru, ca la capătul opus. Tuburile se închid cu capace din folie de aluminiu și se etanșează prin introducerea lor în ceară roșie. 6. Cartuș filtrant. Se folosește un tub de sticlă cu lungimea de 86 mm și diametrul interior de 10 mm, prezentînd trei strangulări, care îl împart în patru compartimente. Tubul are capetele ușor îngustate (5 mm și 8 mm). Pentru captarea hidrocarburilor nesaturate și a vaporilor de apă se folosește silicagel impregnat cu soluție de sulfat de mercur, a cărui culoare trece în galben-cenușiu. Pentru captarea celorlalte hidrocarburi și a unor gaze, se folosește cărbune activ uscat. Pentru captarea altor impurități, ca și pentru indicarea epuizării stratului de cărbune activ, se utilizează silicagel impregnat cu soluție de anhidridă cromică, a cărui culoare portocalie trece în verde-cenușiu la suprafața de contact cu cărbunele. La capătul îngust al cartușului, se plasează un strat de vată și se închide cu o flanșă. Se introduc succesiv, tasînd ușor : silicagel cu sulfat de mercur, pînă la prima strangulare, cărbune activ, pînă la a treia strangulare, apoi silicagel cu anhidridă cromică. Se acoperă cu un strat de vată și o flanșă.

Modul de lucru

Se racordează un capăt al tubului indicator la analizorul de gaze universal UG-2, iar al doilea, la capătul îngust al cartușului filtrant, apoi se aspiră aer. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe una din scările aparatului, gradate în mg CO/litru aer, corespunzînd concentrațiilor : 0,1015—0,120 mg/l, la aspirarea a 220 ml aer, în decurs de 8 minute ; 0,04—0,40 mg/l, la aspirarea a 60 ml aer, în decurs de 5 minute.

4. *Metoda colorimetrică lineară (cu tubul Dräger), din aerul expirat*

Principiu

Aerul expirat se trece printr-un tub Dräger cu o umplutură de pentoxid de iod, care este redus la iod elementar ; acesta colorează în brun suportul alb al tubului.

Materiale

1. Aparat Dräger. 2. Tub Dräger pentru CO. 3. Pungă de PVC prevăzută cu un tub de cauciuc la care este atașată o clemă și terminată cu un tub de sticlă.

Recoltarea probelor

Subiectul este scos din atmosfera poluată cu CO. I se cere să execute 2—3 inspirații și expirații, apoi inspiră profund, se menține în apnee 20 secunde, după care expiră forțat aerul în punga de PVC, care se închide și se transportă la laborator.

Modul de lucru

Se atașează la punga de PVC, pompa Dräger, la care este fixat un tub Dräger pentru CO. Se aspiră aerul din pungă cu ajutorul pompei, pînă cînd stratul alb din tubul Dräger începe să se brunifice. Se oprește pomparea cînd colorarea stratului a ajuns la o diviziune exactă. Se ține seama de numărul de pompări efectuate. Se citesc diviziunile de pe tub pînă unde s-a brunificat.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Se calculează concentrația CO (ppm) după indicațiile din prospectul aparatului. Cunoscînd cantitatea de CO din aerul expirat în ppm, se poate calcula COHb în procente din Hb totală :

$$\% \text{ COHb din Hb totală} = \frac{\text{ppm CO}}{5}$$

Observații

1. Umplutura albă din tubul Dräger este compusă din oxid de seleniu, acid sulfuric și pentoxid de iod. 2. Din aerul recoltat în punga de PVC se poate doza CO prin metodele folosite la aer.

5. *Metoda spectrofotometrică cu clorură paladoasă, din sînge*

Principiu

Oxidul de carbon legat de hemoglobină ca COHb este eliberat din aceasta prin tratarea sîngelui cu un hemolizant (saponina) și un oxidant (fericianura de potasiu) :

$$\text{COHb} \xrightarrow{\text{saponină, fericianură}} \text{Hb} + \text{CO}$$

Oxidul de carbon eliberat reduce clorura paladoasă la paladiu metalic, iar excesul de $PdCl_2$ formează, cu IK în exces, tetraiodopaladat dipotasic, de culoare roșie-brună, colorimetrabil. Cantitatea de CO intrat în reacție se determină prin diferență. Operația se execută într-o celulă de microdifuzie.

Reactivi și materiale

1. Clorură paladoasă, soluție 0,1% (v. Metoda spectrofotometrică 1, din aer). 2. Iodură de potasiu, soluție 20%. Se prepară extemporaneu. 3. Saponină-fericianură. Se dizolvă în 100 ml apă 1 g fericianură de potasiu și 1 g saponină. Se prepară extemporaneu. 4. Celula de microdifuzie. Aceasta este un recipient de sticlă cu două compartimente : unul central, cilindric (C) și altul periferic, inelar (P). Celula se închide ermetic cu o placă de sticlă, șlefuită (celula Conway) sau cu un capac șlefuit (celula Mezincescu) (fig. 26).

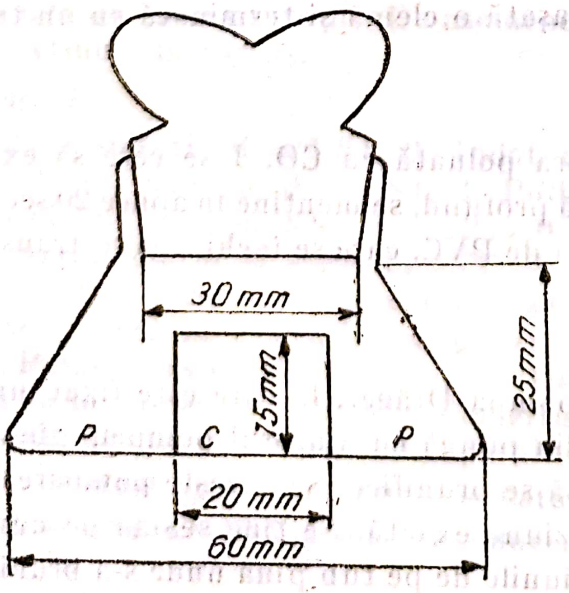


Fig. 25 — Celulă Mezincescu.

Recoltarea probelor

Se recoltează 2—5 ml sînge venos într-un tub mic (care se umple complet cu sînge), conținînd 10 mg oxalat de potasiu pulbere și o bilă de sticlă. Se astupă tubul cu un dop de cauciuc sau plastic, fără a include aer și se omogenizează, răsturnînd tubul de 10—15 ori, fără a scutura. Probele astfel pregătite pot fi păstrate la rece, maximum 24 ore, fără pierdere de COHb.

Modul de lucru

Difuzia. Se pipetează exact 1,0 ml soluție de clorură paladoasă în compartimentul central al celulei și 5 ml saponină-fericianură în compartimentul periferic ; ultimul reactiv are rolul de a hemoliza sîngele, de a elibera CO și de a transforma Hb în MetHb. Se pipetează apoi în compartimentul periferic exact 1,0 ml sînge bine omogenizat și se închide imediat celula. Capacul (placa) se ung cu vaselină sau, preferabil, cu pastă de silicon. Se amestecă lichidul din compartimentul periferic, rotind cu precauție celula ținută orizontal, astfel ca să nu treacă lichid dintr-un compartiment într-altul. Se lasă celula la întuneric aproximativ 24 ore (sau minimum 6 ore). Odată cu seria de probe, se prevede o celulă standard, în care se pipetează numai reactivii, fără sînge, și se tratează identic cu probele.

Spectrofotometrarea. Se deschide celula și se pipetează cu atenție lichidul din compartimentul central, trecîndu-l într-un balon cotat de 50 ml printr-un filtru mic. Se spală compartimentul central de 5—6 ori cu cîte 1 ml apă (luată cu aceeași pipetă), care se trece tot în balon, prin același filtru. Se adaugă în balon 10 ml iodură de potasiu și se completează cu apă la semn.

Se execută aceleași operații pentru celula standard.

Se citește extincția probelor (Ep) la spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă conținînd 10 ml IK 20% în 50 ml apă și extincția standardului (Es) în aceleași condiții.

Calcul

Rezultatele se exprimă în ml CO/100 ml sînge, g COHb/100 ml sînge sau % COHb din Hb totală :

$$\text{mg } PdCl_2 \text{ redus} = A = \frac{Es - Ep}{Es}$$

în care :

Ep, respectiv Es = extincția probei, respectiv a standardului.

1 mg $PdCl_2$ este redus de 0,1261 ml CO degajat din 0,0941 g COHb, iar proba luată în lucru este de 1 ml sînge :

$$\text{ml CO/100 ml sînge} = A \cdot 0{,}1261 \cdot 100$$

$$\text{g COHb/100 ml sînge} = A \cdot 0{,}0941 \cdot 100$$

$$\text{COHb \% din Hb totală} = \frac{\text{g COHb/100 ml sînge}}{\text{g Hb totală/100 ml sînge}} \cdot 100$$

Este deci necesară dozarea hemoglobinei totale.

Dozarea spectrofotometrică a hemoglobinei totale

Principiu

Hemoglobina se transformă în cianhemoglobină stabilă, care prezintă un coeficient molar de extincție precis la o anumită lungime de undă și o diluție definită.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi

1. Soluție Drabkin. Se dizolvă succesiv : 0,05 g cianură de potasiu, 0,2 g fericianură de potasiu și 0,14 g fosfat monopotasic (KH_2PO_4) în 1 000 ml apă. Se adaugă 0,5 g saponină și se omogenizează. Soluția se conservă indefinit, în flacon brun, la rece.

Modul de lucru

Se pipetează într-o eprubetă exact 5,0 ml soluție Drabkin. Se introduc 0,02 ml sînge omogenizat, cu ajutorul pipetei de hemoglobină, spălînd pipeta de trei ori cu soluția din eprubetă, fără a barbota, și se omogenizează fără a scutura. Se poate lucra și pipetînd 0,2 ml sînge într-un balon cotat de 50 ml și aducînd la semn cu soluție Drabkin. Se citește extincția, Ep, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 540$ nm, în cuva de 1 cm, față de soluție Drabkin.

Calcul

Rezultatele se exprimă în g Hb totală/100 ml sînge :

$$\text{g Hb totală/100 ml sînge} = Ep \cdot \frac{M}{K_{540}} \cdot 10^{-1} \cdot \frac{5{,}02}{0{,}02} = Ep \cdot 36{,}8$$

în care :

Ep = extincția probei ;
M = masa moleculară a hemoglobinei = 16 114 ;
K_{540} = coeficientul de extincție molar (la $\lambda = 540$ nm) = $11 \cdot 10^{-3}$
5,02/0,02 = diluția.

Dacă se lucrează cu 0,2 ml sînge diluat la 50 ml cu soluție Drabkin, formula devine :

$$\text{g Hb totală/100 ml sînge} = Ep \cdot 36{,}6$$

Observații

Coeficientul molar de extincție, K_{540}, se poate determina, avînd soluții de Hb standardizată, după formula :

$$K_{540} = \frac{\text{concentrația standard a Hb}}{\text{extincția}}$$

Concentrația standard a Hb este înscrisă pe fiolă. În lipsa standardului de Hb, se lucrează cu valoarea 36,8 pentru coeficientul molar de extincție, la diluția 0,02/5,02.

Interpretarea rezultatelor

Valorile normale ale Hb în g/100 ml sînge, sînt : 15(13—17) pentru bărbați și 13(11—15) pentru femei.

Dozarea carboxihemoglobinei

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Metoda se bazează pe diferența de absorbție la $\lambda = 555$ nm și $\lambda = 480$ nm a carboxihemoglobinei, înainte și după tratare cu un reducător.

Reactivi

1. Amoniac 0,4%. Se aduc 16 ml amoniac 25% cu apă la 1 000 ml. 2. Ditionit de sodiu ($Na_2S_2O_4 \cdot 2\,H_2O$) cristalizat. 3. Acid formic concentrat. 4. Acid sulfuric concentrat.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Prepararea scării etalon. Se recoltează sînge de la un nefumător, pe anticoagulant, și se supune, timp de 2 ore, la barbotare cu un curent de CO, cu o viteză de 2—3 bule/minut. Se scoate eprubeta cu sîngele astfel tratat, conținînd 100% COHb, din circuitul de CO, se închide etanș și se păstrează pînă a doua zi. Se diluează 2—3 picături din acest sînge cu amoniac, 5—6 ml astfel ca extincția să fie de 0,5—0,6. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm și la 480 nm, în cuva de 1 cm, față de amoniac 0,4%. Peste soluția din cuvă se adaugă cîteva cristale de ditionit, se agită pentru omogenizare și se citește extincția probei în condițiile de mai sus. Se calculează rapoartele extincțiilor la 555 nm și 480 nm, în sîngele ca atare (neredus) și la sîngele tratat cu ditionit (redus), obținîndu-se coeficientul K:

$$K = \frac{E_{555}/E_{480}\ (\text{neredus})}{E_{555}/E_{480}\ (\text{redus})}$$

Pentru sîngele saturat în CO (100% COHb) valoarea raportului este apropiată de 1.

Se prelucrează în mod identic o diluție de sînge lipsit de CO (0 % COHb), se citesc extincțiile la 555 nm și 480 nm, înainte și după tratare cu ditionit și se calculează raportul R_1, a cărui valoare este 0,52—0,53.

În același mod se pot face determinări ale raportului pentru concentrații intermediare de COHb, realizînd diluții din proba diluată, utilizată pentru determinarea lui R.

Cu aceste valori se trasează curba standard, marcînd pe ordonată valorile raportului K, K_1 etc., iar pe abscisă, procentajul de COHb.

Determinarea conținutului în COHb. Se iau 2—3 picături din sîngele de analizat și se diluează cu 5—6 ml de amoniac 0,4%, astfel ca extincția să fie de 0,5—0,7 nm. Se citesc extincțiile la $\lambda = 555$ nm și 489 nm, apoi se adaugă în cuvă cîteva cristale de ditionit și se citesc extincțiile probei reduse. Cu aceste valori se calculează raportul Rp, care se raportează la curba standard, aflîndu-se concentrația COHb în %.

Observații

Oxidul de carbon necesar obținerii sîngelui cu 100% COHb (și eventual cu alte procentaje) se prepară din acid formic și acid sulfuric. Ambii acizi se introduc într-o eprubetă închisă cu un dop prin care trece un tub de sticlă, ce conduce CO spre un absorbitor cu apă distilată (pentru reținerea eventualelor urme de acizi). Apoi CO astfel preparat este barbotat prin sîngele recoltat de la un nefumător, servind pentru obținerea scării standard.

2. *Metoda rapidă (metoda Wolff)*

Principiu

Metoda se bazează pe faptul că COHb este mai rezistentă decît HbO_2 la acțiunea unor substanțe.

Reactivi

1. Soluție tampon acid acetic-acetat, pH 5—5,1. Se amestecă un volum acid acetic 3 N și 3 volume acetat de sodiu 3 N. 2. Amoniac 0,3%.

Modul de lucru

Calitativ. Se diluează 1 ml sînge cu 4 ml apă distilată, se agită și se filtrează. Se ia 1 ml filtrat și se adaugă 4 ml soluție tampon 5,0—5,1. Se astupă

eprubeta cu dop de vată și se menține în termostat la 55°C timp de 5 minute. Dacă sîngele este normal se formează un coagul, iar supernatantul este incolor. Dacă sîngele conține CO, supernatantul este colorat în roz-roșu, intensitatea coloraţiei fiind proporţională cu cantitatea de COHb.

Cantitativ. Se diluează 1 ml sînge cu 4 ml amoniac 0,3%, se filtrează, se ia 1 ml filtrat și se diluează din nou cu 4 ml amoniac 0,3%. Dacă coloraţia acestei probe este egală în intensitate cu aceea a probei calitative, se consideră 100% COHb. Dacă există diferenţă între cele două probe, se ia 1 ml din proba diluată cu amoniac și filtrată și se adaugă, din biuretă, amoniac 0,3% pînă la egalizarea intensităţii coloraţiei cu aceea obţinută la proba calitativă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în % COHb:

$$\% \text{ COHb} = \frac{A}{C + A} \cdot 100$$

în care:

A = volumul de sînge luat în lucru, în ml;

C = volumul de soluţie de amoniac 0,3% folosit pentru egalizarea tentelor celor două probe, în ml.

Interpretarea rezultatelor

În condiţii normale — în atmosfera obișnuită a oraşelor — se găsesc în sînge pînă la 1,5% COHb la nefumători și pînă la 8—10% COHb la fumători. Cînd proporţia de COHb depășește 10% apar, în general, simptomele de intoxicaţie, considerate corelate cu procentajul de COHb (tabelul 3).

Tabelul 3

Relaţia dintre concentraţia COHb din sînge și simptomatologie
(după Mogoș)

Forma intoxicaţiei	COHb %	*Simptomatologie*
Ușoară	10—30	Cefalee, greţuri ușoare, disconfort abdominal, dispnee de efort (cînd COHb se apropie de 30)
Medie	30—40	Cefalee severă, greţuri, vărsături, ameţeli, dispnee și sincopă de efort
Severă	>40	Tulburări de vedere, ataxie, sincopă, euforie, tahicardie, tahipnee
	50—60	Comă, respiraţie Cheyne-Stokes, convulsii intermitente
	>60	Comă profundă, șoc, risc de sucombare în stare de șoc sau convulsii
Fulgerătoare	80	Moarte fulgerătoare

Scanned with OKEN Scanner

II.2. DETERMINAREA UNOR METALE ȘI A COMPUȘILOR LOR

II.2.1. MERCURUL

A. **Izolare**

Mercurul sub formă de vapori și compușii săi, sub formă de aerosoli și pulberi, sînt reținuți din aer în soluții absorbante.

Mercurul din urină (eliminat sub formă de compuși anorganici sau legat de substanțe organice), ca și mercurul din alte produse biologice, corpuri delicte, alimente, produse agroalimentare contaminate etc., necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare.

B. **Determinare rapidă din aer**

1. *Hîrtia indicatoare* în prezența vaporilor de mercur își modifică culoarea de la gălbui la roz. Timpul de virare a culorii indică, cu aproximație, concentrația vaporilor de Hg:

— timpul de virare (minute)	15	20	30
— concentrația vaporilor de Hg (μg/l)	0,7	0,3	0,2

Hîrtia indicatoare se prepară astfel: se amestecă 200 ml soluție 10% sulfat de cupru cu 200 ml soluție 10% iodură de potasiu. Se lasă să se sedimenteze și se decantează lichidul. Se spală precipitatul de 2—3 ori cu apă distilată, o dată cu soluție 1% iodură de potasiu, o dată cu soluție 1% sulfit de sodiu, apoi, din nou, de 2 ori cu apă distilată, eliminînd lichidele de spălare prin decantare. Se absoarbe apa rămasă cu ajutorul unei benzi de hîrtie de filtru. Se trece precipitatul într-un Berzelius și se adaugă o cantitate mică de etanol, astfel încît să se obțină o pastă semilichidă. Se întinde pasta, cu ajutorul unui tampon de vată, pe benzi de hîrtie de filtru, în strat subțire și uniform. Se usucă benzile la temperatura laboratorului, apoi se păstrează în borcane cu dop rodat într-un spațiu lipsit de vapori de mercur.

2. *Tuburile Dräger* umplute cu silicagel impregnat cu iodură cuprică sau clorură aurică își modifică culoarea în prezența vaporilor de mercur. Concentrația în mercur, corespunzînd cu lungimea stratului colorat, se citește direct pe scara gradată imprimată pe tub. Domeniul de măsurare este cuprins între 0,1 și 2 mg Hg/m^3.

C. **Identificare din produse biologice sau alte produse**

Soluția de analizat se tratează cu:

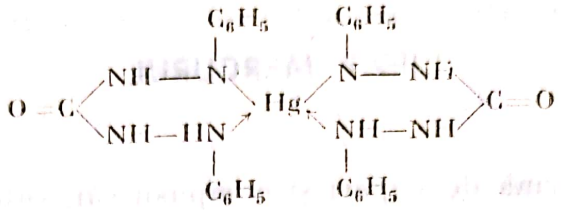
1. *Soluție de KI 1%*: apare un precipitat roșu-portocaliu de HgI_2, solubil în exces de reactiv cu formarea complexului $[HgI_4]^{2-}$.

2. *Soluție de $SnCl_2$ 2%*: se formează inițial un precipitat alb, prin reducerea sărurilor de Hg^{2+} la Hg^+, apoi un precipitat negru, prin reducere, în continuare, la Hg metalic;

3. *Reactiv Cheramy* (1 g KI, 0,25 g clorhidrat de chinină la 100 ml apă): apare o opalescență sau un precipitat alb-gălbui de iodomercurat de chinină. Sensibilitatea: 1 μg/probă;

Scanned with OKEN Scanner

4. *Reactiv Caseneuve* (soluție saturată de difenilcarbazidă în benzen, etanol sau eter) : se formează o colorație albastră-violetă datorită unui complex, de forma :



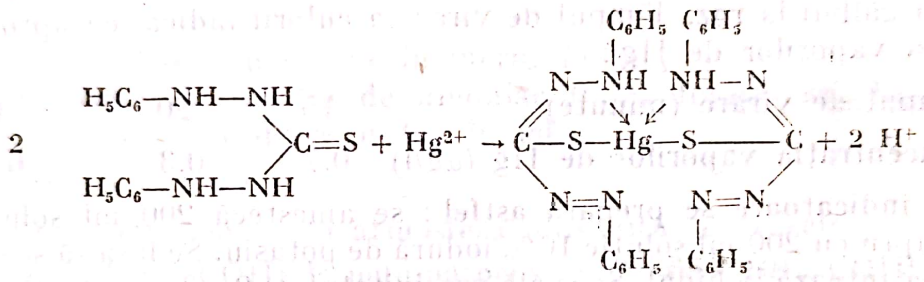
Sensibilitatea reacției este de 0,5 μg/ml.

D. **Dozare din aer**

1. *Meloda spectrofotometrică*

Principiu

Mercurul formează cu ditizona (difeniltiocarbazona) la pH = 1,5—2,0 un complex de culoare portocalie :



Sensibilitatea reacției este de 0,1 μg/ml. Specificitatea este asigurată în condițiile metodei, deoarece ditizona dă complecși colorați cu mai multe metale, însă la pH 1,5—2,0 toate metalele, cu excepția mercurului și a argintului, formează chelați cu EDTA-Na_2, astfel încît mercurul este singurul metal (argintul nefiind prezent în locurile de muncă) capabil să dea ditizonat.

Reactivi

1. Acid sulfuric concentrat (d = 1,84) și diluat (1 : 1). 2. Permanganat de potasiu, soluție saturată (filtrată prin Gogch G_3). 3. Galben de metanil, soluție 0,1%. 4. Roșu de fenol, soluție 0,1%. 5. Ditizonă, soluție stoc 0,1% în cloroform. Se poate conserva în sticle brune, timp de o săptămînă, la frigider. 6. Ditizonă, soluție 0,005% în toluen. Se diluează soluția stoc în cloroform, cu toluen, în proporție de 1 : 20. 7. Hidroxilamină, soluție 10%. Se dizolvă 50 g hidroxilamină clorhidrică în 400 ml apă. Se adaugă o picătură de roșu de fenol și se aduce soluția la pH 6,8 cu amoniac, adăugat în porțiuni mici, pînă la obținerea virajului roz. Soluția de hidroxilamină se demetalizează prin agitare cu porțiuni mici, repetat, de soluție cloroformică de ditizonă 0,1—0,05%, pînă cînd culoarea ditizonei nu se mai schimbă. Apoi se spală de 2—3 ori cu porțiuni mici de cloroform și se aduce la 500 ml cu apă. 8. EDTA-Na_2, soluție aproximativ 0,1 N. Se dizolvă 2 g etilendiamintetraacetat disodic în 1 000 ml apă. 9. Soluție de spălare. Se amestecă 980 ml hidroxid de sodiu 0,2 N cu 20 ml hidroxilamină preparată ca mai sus. Soluția de NaOH nu trebuie să fie carbonatată, așa încît se prepară o soluție saturată de NaOH prin dizolvarea a 110 g NaOH în 100 ml apă și se lasă să se

depună carbonatul. Din această soluție stoc se iau 17 ml (soluție limpede), căreia i se adaugă 800 ml apă. Se titrează cu HCl 0,2 N. Se ajustează, diluînd cu apă în proporția necesară, pentru a se obține o soluție de NaOH exact 0,2 N. 10. Toluen pur. 11. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,1354 g clorură mercurică sau 0,1663 g nitrat mercuric, [$Hg(NO_3)_2$ 1/2 H_2O], în 1 000 ml acid azotic diluat 1 : 50 (1 ml = 0,1 mg mercur). 12. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1 : 100 (1 ml = 1 μg mercur). 13. Amoniac d = 0,88.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 100 litri de aer cu un debit de 2—3 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 8 ml permanganat de potasiu și 2 ml acid sulfuric diluat 1 : 1 cu apă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevede încă unul, cu aceiași reactivi ca mai sus, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin el, constituind proba martor.

Pregătirea probelor

Se reduce excesul de permanganat în absorbitor prin adăugarea, picătură cu picătură, de hidroxilamină pînă la decolorarea completă a probei, adăugîndu-se în plus încă 5 ml de hidroxilamină. Se trece cantitativ soluția din absorbitor într-un balon, se adaugă 2 picături de galben de metanil și apoi amoniac în porțiuni mici, răcind balonul sub robinet, pînă la viraj în galben. Se adaugă, picătură cu picătură, acid sulfuric 1 : 1 pînă la reapariția culorii roșii-portocalii (pH 1,5—2,0). Se lasă probele în repaus minimum 2 ore, acoperite.

Modul de lucru

Proba astfel pregătită se trece cantitativ într-o pîlnie de separare, se adaugă 5 ml EDTA-Na_2. Se emestecă, apoi se adaugă în pîlnie 2 ml ditizonă în toluen și se agită 30 de secunde. Se observă stratul toluenic : dacă acesta este galben se mai adaugă încă 2 ml ditizonă și se agită din nou 30 secunde. Adăugarea de ditizonă se repetă pînă la persistența culorii verzi a ditizonei. Se adaugă toluen pînă la completarea volumului toluenic la 10 ml, se elimină faza apoasă și se spală toluenul cu 10 ml apă, care se îndepărtează. Se adaugă 20 ml soluție de spălare și se agită ușor 15 secunde. Se elimină prima soluție de spălare și se repetă spălarea cu soluție de spălare încă o dată, eliminînd cît mai complet soluția apoasă. Se filtrează toluenul într-o eprubetă, printr-un filtru mic, uscat.

În paralel se lucrează martorul, la fel ca și probele.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = 490 nm în cuve de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 4 și 20 μg mercur, prin puncte din 4 în 4, în condițiile descrise mai sus.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a mercurului în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg mercur/m^3 :

$$mg/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația mercurului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

E. Dozare din urină

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Principiul metodei este același ca la dozarea mercurului în aer. Se execută însă, în prealabil, distrugerea substanțelor organice din urină (mineralizare).

Reactivi

Reactivii sînt aceiași ca la dozarea mercurului din aer.

Recoltarea probelor

Urina se recoltează în recipiente spălate cu acid azotic diluat 1 : 25 și cu multă apă bidistilată. Se recoltează o singură emisiune (spot) sau se colectează urina din 24 de ore. Dacă se păstrează probele mai mult de 24 de ore, se adaugă 1/50 din volum acid sulfuric d = 1,84 și se ține seama de acest adaos la măsurarea probei luate în lucru.

Pregătirea probelor

Se măsoară 50 ml urină într-un flacon de 250 ml. Se adaugă 5 ml acid sulfuric d = 1,84 și 15 ml permanganat de potasiu soluție saturată.

Se încălzește pe baia de nisip (moderat încălzită, astfel ca lichidul să nu ajungă la fierbere) acoperind flaconul cu sticlă de ceas. Se continuă încălzirea pînă cînd lichidul devine limpede și incolor, avînd un precipitat brun la fund. Dacă se consumă tot permanganatul se mai adaugă cîțiva ml și se continuă încălzirea flaconului pînă la decolorarea completă a lichidului.

După răcirea lichidului se reduce excesul de permanganat adăugînd hidroxilamină soluție 10%, picătură cu picătură, pînă la dispariția precipitatului brun și apoi încă 5 ml în plus.

Se adaugă 2 picături de galben de metanil și apoi amoniac, în porțiuni mici, răcind flaconul sub robinet pînă la viraj galben.

Se adaugă picătură cu picătură acid sulfuric 1 : 1 pînă la reapariția culorii roșii-portocalii (pH 1,5—2,0). Se lasă probele în repaus, acoperite, minimum 2 ore.

Modul de lucru

Proba astfel pregătită se trece cantitativ într-o pîlnie de separare și se adaugă 5 ml de EDTA-Na_2, se amestecă, se adaugă în pîlnie 2 ml ditizonă în toluen și se agită 30 secunde. Se observă stratul toluenic : dacă este galben, se mai adaugă încă 2 ml ditizonă și se agită din nou 30 secunde. Adăugarea de ditizonă se repetă pînă la persistența culorii verzi a ditizonei. Se adaugă toluen pînă la completarea volumului toluenic la 10 ml. Se elimină faza apoasă și se spală toluenul cu 10 ml apă, care se îndepărtează. Se adaugă 20 ml soluție de spălare și se agită ușor 15 secunde. Se elimină prima soluție de spălare și se repetă spălarea cu soluție de spălare încă o dată, eliminîndu-se cît mai complet soluția apoasă. Se filtrează toluenul într-o eprubetă, printr-un filtru mic, uscat.

În paralel se lucrează un martor, trecut prin toate operațiile descrise.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 490$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 4 și 20 μg mercur, prin puncte din 4 în 4, în condițiile descrise mai sus.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a mercurului în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg Hg/litru urină sau în μg Hg urinar în 24 ore.

Pentru proba de 50 ml urină luată în lucru :

$$\mu g \text{ Hg/litru urină} = C \cdot 20$$

$$\mu g \text{ Hg/24 ore} = C \cdot 20 \cdot V_{24}$$

în care :

C = concentrație Hg în μg ;

V_{24} = volumul de urină în 24 ore, în litri.

Observații

Mineralizarea probelor de urină trebuie să fie completă (lichidul să fie complet incolor și cu precipitat brun la fund). Pentru urini concentrate, cu multă substanță organică, pot fi necesare pînă la 24 ore de încălzire. Trebuie să se aibă în vedere ca în toată această perioadă de timp să se asigure un exces de permanganat (să nu dispară complet precipitatul brun).

Interpretarea rezultatelor

La persoanele fără expunere profesională la mercur, se pot elimina pînă la 24 μg Hg/24 ore. Nivele superioare a 100 μg/24 ore sînt apreciate ca semn de impregnare cu mercur a organismului.

II.2.2. PLUMBUL ȘI PLUMBTETRAETILUL

A. Izolare

Plumbul și compușii anorganici (oxizi) sub formă de aerosoli și plumbtetraetilul (PbTE) sub formă de vapori sînt reținuți din aer în soluții absorbante, sau în dispozitive filtrante de reținere.

Plumbul din urină și sînge, unde se găsește sub formă de compuși anorganici sau legat de substanțe organice (în sînge, majoritatea plumbului se află în hematii), ca și plumbul din alte produse biologice, corpuri delicte, alimente impurificate etc., necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare.

B. Determinare rapidă din aer

1. *Hîrtia impregnată cu tetraoxichinonă* (soluție 0,2% în alcool de 96°) : în prezența particulelor de plumb și după aplicarea soluției tampon pH 2,8 (1,9 g bitartrat de sodiu și 1,5 g acid tartric în 100 ml apă) apare o culoare roz. Soluția de tetraoxichinonă este stabilă cîteva luni, iar soluția tampon, maximum 10 zile. Determinarea este interferată de Cd^{2+}, dacă este în concentrație mai mare decît aceea a Pb.

Scanned with OKEN Scanner

C. **Identificare din produse biologice sau alte produse**

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Dicromat de potasiu 5% :* apare un precipitat galben de $PbCrO_4$, insolubil în acid acetic, solubil în acid azotic (deosebire de $TlCrO_4$) și hidroxid de potasiu (deosebire de $BaCrO_4$). Sensibilitate : 10 μg/ml.

2. *Iodură de potasiu 5% :* se formează un precipitat galben de PbI_2, solubil în exces de reactiv. Precipitatul se dizolvă la încălzire și depune la răcire cristale sub formă de paiete galben-aurii, cu aspect caracteristic la microscop (steluțe, plăcuțe hexagonale). Sensibilitate : 0,3 μg/ml.

3. *Acid azotic 10%, iodură de K 40%, cîteva picături soluție de cocaină 4% :* apare un precipitat alb-gălbui de iodoplumbat de cocaină (PbI_3-cocaină). Sensibilitate : 1 μg/ml.

4. *Rodizonat de Na 1% :* se dezvoltă o culoare brun-violetă. Sensibilitate : 0,1 μg/ml. Interferă Ba^{2+} și Sr^{2+}.

D. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru plumb*

Principiu

Plumbul formează cu ditizona (difeniltiocarbazona) la pH 9—11 un complex de culoare roșie.

Sensibilitatea reacției este de 0,1 μg/ml. Specificitatea este asigurată atît de pH-ul la care se face extracția, cît și de adăugarea de complexanți (citrat, cianură) care leagă metalele interferente, lăsînd să reacționeze cu ditizona numai plumbul liber.

Reactivi

1. Acid azotic, d = 1,45 și diluat 1 : 25 cu apă. 2. Amoniac d = 0,88. 3. Cloroform. 4. Soluție tampon cu complexanți : se dizolvă 100 g acid citric în aproximativ 60 ml apă și se adaugă amoniac în porțiuni mici, răcind sub robinet, pînă la pH aproximativ 6,8 (viraj în roșu aprins cu roșu de fenol, încercînd cu picătura pe o placă de porțelan), se adaugă apoi 2,5 g sulfit de sodiu și 5 g cianură de potasiu, se aduce cu apă la 500 ml. Se demetalizează soluția agitînd-o (într-o pîlnie de separare) cu porțiuni succesive de ditizonă 0,05% în cloroform, pînă cînd culoarea ditizonei nu se mai modifică. Se spală cu 2—3 porțiuni a cîte 10 ml cloroform și se adaugă pînă la 1 000 ml amoniac. 5. Ditizonă, soluție 0,01% în cloroform, preparată proaspăt, prin cîntărirea substanței sau prin diluarea unei soluții stoc de ditizonă 0,1% în cloroform, care se poate conserva la frigider aproximativ o săptămînă. 6. Soluția de spălare : se dizolvă 0,1 g cianură de potasiu în 1 000 ml apă și se adaugă 10 ml amoniac. 7. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,1596 g azotat de plumb în 1 000 ml acid azotic diluat 1 : 100 (1 ml = 0,1 mg Pb). 8. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1 : 100 (1 ml = 1 μg Pb).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 40 litri aer, cu un debit de 10 litri/minut, printr-o alonjă cu vată de sticlă sau printr-un dispozitiv filtrant cu două rondele suprapuse de hîrtie de filtru.

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se prevede încă unul, care se manipulează și transportă în teren, fără a aspira aer prin el, constituind proba martor.

Pregătirea probelor

Filtrele sau vata din alonjă se extrag într-un pahar cu 5—6 porțiuni a cîte 5 ml acid azotic 1 : 25 fierbinte, trecîndu-se soluția într-un balon cotat de 50 ml. Se aduce la semn cu apă.

Modul de lucru

Se pipetează într-o pîlnie de separare de 200 ml, 25 ml din soluția din balonul cotat (deci 1/2 din probă) și se adaugă 15 ml soluție tampon. Se adaugă ditizonă soluție 0,01% în cloroform în porțiuni succesive, a cîte 2 ml, agitînd pîlnia cîte 30 secunde după fiecare adăugare, observînd culoarea fazei cloroformice. Se repetă adăugarea de ditizonă pînă cînd faza cloroformică capătă o nuanță violacee, indicînd exces de ditizonă. Se adaugă cloroform, cît este necesar pentru a completa volumul stratului cloroformic la 10 ml. Dacă au fost necesare mai mult de 5 porțiuni a cîte 2 ml ditizonă, se aduce volumul final la 20 ml și se ține seama la calcul. Este însă recomandabil să se reia determinarea cu un alicot mai mic (1/4 sau 1/5 din probă). După separarea completă a celor două faze, stratul cloroformic se trece într-o a doua pîlnie de separare, în care s-au pus 20 ml soluție de spălare și se agită timp de 15 secunde. Se trece faza cloroformică într-o a treia pîlnie de separare cu 20 ml soluție de spălare, se agită 15 secunde și, după separarea fazelor, se filtrează stratul cloroformic într-o eprubetă, printr-un filtru mic, uscat.

În paralel se lucrează martorul la fel cu probele.

Se măsoară extincția la spectrofotometru la $\lambda = 500$ nm în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 4 și 20 μg plumb, prin puncte din 4 în 4, în condițiile descrise mai sus.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a plumbului în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg plumb/m³ aer, conform relației (în cazul cînd s-a lucrat cu 1/2 din probă și 10 ml volum final) :

$$\text{mg/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 2$$

în care :

C = concentrația plumbului, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru plumbtetraetil*

Principiu

Principiul metodei este același ca la dozarea Pb din aer. Se execută însă, în prealabil, mineralizarea compusului organic și eliberarea plumbului sub formă ionică.

Reactivi

Reactivii sînt aceiași ca la dozarea plumbului din aer, în plus : cărbune activ, granulație 0,05—0,1 mm.

Recoltarea probelor

Vaporii de plumbtetraetil (PbTE) nu sînt reținuți satisfăcător în soluții absorbante, de aceea se utilizează cărbune activ uscat.

Scanned with OKEN Scanner

Dispozitivul de reținere este format dintr-o alonjă simplă (alonjă pentru pulberi) în care se introduce cărbune activ. Se închide unul din capetele alonjei cu un tampon de vată de sticlă, se umple alonja cu cărbune activ, avînd grijă ca acesta să fie uniform tasat și se închide alonja cu un alt tampon de vată de sticlă. Se îndepărtează praful fin de cărbune, aspirînd prin alonjă 100—200 litri de aer curat cu viteza de 20 l/minut. Alonjele astfel pregătite se mențin 24 ore în etuvă la 110°, iar după răcire se închid cu dopuri de sticlă și se păstrează în exsicator.

Se aspiră prin alonjă aerul de analizat, cu un debit de 20 litri/minut (sau chiar mai mult). Volumul minim de aer necesar este de 400 litri.

Modul de lucru

Conținutul alonjei — inclusiv tampoanele de vată de sticlă — se trece într-un Berzelius de 100 ml și se adaugă 20 ml acid azotic concentrat. Se amestecă cu o baghetă și se lasă 24 ore, acoperit cu sticlă de ceas. Extrasul se filtrează printr-un filtru cu placă poroasă G_3 într-o capsulă, spălînd cărbunele și tampoanele de vată de sticlă de 3 ori cu cîte 5 ml acid azotic concentrat. Extrasul limpede se evaporă la sicitate pe baia de nisip, în nișă. Reziduul se dizolvă în 10 ml acid azotic 4%, care se aduc într-o pîlnie de separare. Capsula se spală cu 2—3 porțiuni de apă distilată și lichidele de spălare se aduc în pîlnie, peste acidul azotic. Soluția din pîlnie se tratează cu 15 ml soluție tampon și se prelucrează, în continuare, ca la dozarea plumbului în aer.

Valoarea extincției obținută pentru probe se raportează la curba de etalonare pentru plumb, obținîndu-se concentrația C a plumbului în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg PbTE/m³ :

$$\text{mg PbTE/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1{,}56$$

în care :

C = concentrația plumbului, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri ;

1,56 = factorul de transformare a Pb în PbTE.

E. Dozare din urină și sînge

1. *Metoda spectrofotometrică pentru plumb*

Principiu

Principiul metodei este același ca la dozarea plumbului din aer. Se execută însă, în prealabil, distrugerea substanțelor organice din produsele biologice (mineralizare).

Reactivi

Reactivii sînt aceiași ca la dozarea plumbului din aer (reactivii 1—8), în plus : 9. Acid tricloracetic, soluție 10% și 5%. 10. Acid percloric 60% sau 70%. 11. Permanganat de potasiu, soluție saturată ; se saturează la rece 100 ml apă cu aproximativ 10 g permanganat, agitînd și lăsînd să se depună excesul. Se filtrează prin filtru de sticlă G_3. 12. Hidroxilamină, soluție 10% : se dizolvă 50 g hidroxilamină clorhidrică în 400 ml apă, se adaugă o picătură

de roșu de fenol și se aduce la pH 6,8 cu amoniac în porțiuni mici, pînă la viraj în roz (sau se încearcă cu picătura pe o placă de porțelan). Se demetalizează soluția, agitînd-o cu porțiuni succesive de soluție de ditizonă în cloroform, pînă ce soluția nu își mai schimbă culoarea verde. Se spală de 2—3 ori cu porțiuni mici de cloroform și se aduce la 500 ml cu apă.

Recoltarea probelor

Urină: recipientele de recoltare trebuie spălate cu detergent și multă apă de robinet, apoi cu acid azotic diluat 1 : 10 și cu apă bidistilată. Se recoltează o singură emisiune (spot) sau se colectează urina din 24 ore. Dacă probele se păstrează mai mult de 24 ore, se adaugă 1/20 din volum, acid azotic d = 1,42 și se ține seama de acest adaos la măsurarea probei luate în lucru.

Sînge: se recoltează sîngele prin puncție venoasă, cu ac inoxidabil (sterilizat prin fierbere, într-un pahar de sticlă, în apă bidistilată) și cu seringă în întregime din sticlă (Luer). Este preferabil să nu se aspire sîngele în seringă, ci să se lase să curgă direct din ac într-un flaconaș de 25—50 ml în care se găsește 0,1 g fluorură de sodiu. Sîngele se amestecă bine cu fluorura, cu o baghetă subțire. Se recoltează puțin mai mult de 10 ml sînge.

Pregătirea probelor

Urină: într-un flacon de 103 ml se pipetează 25 ml urină (dacă aceasta provine de la subiecți netratați cu EDTA-Ca) sau numai 5 ml urină (dacă se dozează eliminarea plumbului după tratament). Se adaugă 1/10 din volum acid azotic d = 1,42 și 1/3 din volum soluție saturată de permanganat. Se încălzește pe baia de nisip (moderat ca lichidul să nu fiarbă), pînă ce lichidul devine incolor și limpede, cu un depozit brun la fund. Dacă se consumă tot permanganatul (dispare depozitul), se mai adaugă cîțiva ml permanganat, continuîndu-se încălzirea. Pentru a obține o mineralizare rapidă (15—30 minute) se poate aduce lichidul la fierbere pe o plită electrică, însă se cere o supraveghere continuă, cu adăugarea permanganatului în porțiuni succesive, avînd în vedere și posibilitatea unei reacții violente.

După răcirea soluției se reduce excesul de permanganat adăugînd hidroxilamină, picătură de picătură, pînă la dispariția precipitatului brun; se adaugă încă 2 ml hidroxilamină.

În paralel se prepară un martor, cu apă în loc de urină, care se tratează la fel cu probele de urină.

Sînge: se pipetează 10 ml sînge (omogenizat prin amestecare cu bagheta) într-o eprubetă de centrifugă de 50 ml în care se găsesc 10 ml apă. Se amestecă pentru hemolizare și se adaugă, amestecînd, 10 ml acid tricloracetic 10%. Se amestecă cu bagheta, se lasă în repaus o oră și se centrifughează 5 minute la 3 000 rot./min. Se decantează supernatantul într-un flacon de 100 ml. Peste precipitatul din tub se adaugă 10 ml acid tricloracetic 5%, se suspendă precipitatul și se decantează în același flacon. Se adaugă la extrasul tricloracetic, 5 ml acid azotic d = 1,42 și se încălzește pe baia de nisip pînă ce rămîn 5 ml lichid. Se răcește, se adaugă 0,5 ml acid percloric și se încălzește din nou, pînă la uscare. Dacă reziduul nu este perfect alb, se mai adaugă (după răcire) 1—2 ml acid azotic și 2—3 picături de acid percloric, apoi se evaporă din nou. Se adaugă 2—3 ml apă și se evaporă. Reziduul se dizolvă în 10—15 ml acid azotic diluat (1 : 25).

Scanned with OKEN Scanner

În paralel se prepară un martor, cu 15 ml acid tricloracetic 10%, care se tratează la fel cu probele de sînge.

Modul de lucru

Se trece lichidul de mineralizare într-o pîlnie de separare, reluînd cu cîteva porțiuni de apă pînă la aproximativ 40 ml. Se adaugă apoi 15 ml soluție tampon [illegible]că soluția se tulbură se mai adaugă soluție tampon pînă la limpezirea completă a soluției.

Se prelucrează, în continuare, ca la dozarea plumbului din aer.

Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a plumbului, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă, pentru urină, în μg plumb/litru urină sau μg plumb eliminat/24 ore. Pentru eliminări mari de plumb (după tratament cu EDTA-Ca), rezultatele se exprimă în mg plumb/24 ore:

$$\mu g \text{ plumb/litru urină} = \frac{C}{Vp} \cdot 1\,000$$

$$\mu g \text{ plumb eliminat/24 ore} = \frac{C}{Vp} \cdot V_{24}$$

în care:

C = concentrația plumbului, în μg;

Vp = volumul probei luate în lucru, în ml;

V_{24} = volumul de urină din 24 ore, în ml.

Rezultatele se exprimă, pentru sînge, în μg plumb/100 ml sînge:

$$\mu g \text{ plumb/100 ml sînge} = C \cdot 10$$

în care:

C = concentrația plumbului, în μg;

10 = volumul de sînge luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică de absorbție atomică pentru plumb*

Principiu

Plumbul, complexat cu o sare solubilă a acidului pirolidinditiocarbonic, PDTC-NH_4(Na), la pH 2,0—2,5, se extrage cu metilizobutilcetonă. Extractul organic se injectează în atomizor, determinîndu-i-se absorbția în comparație cu un etalon. Domeniul optim de lucru este de 1—10 μg Pb în cantitatea de probă introdusă în aparat.

Aparatură

1. Spectrofotometru de absorbție atomică de tipul Perkin-Elmer-300. 2. Atomizor HGA-72. 3. Pipete Eppendorf. 4. Eprubete de centrifugă de tipul Sovirel.

Reactivi

1. Tampon citrat pH (46 ml soluție de acid clorhidric 1 M și 3,5 ml soluție de citrat de sodiu 1 M se completează cu apă bidistilată la 100 ml);

2. Acid pirolidin-ditiocarbonic PDTC-NH_4 (Na), soluție 2% în apă bidistilată. 3. Metil-izobutilcetonă (MIBK), soluție saturată cu apă. 4. Soluție standard stoc cu un conținut de 1 mg Pb/ml în HNO_3 (1 : 100 v/v). 5. Soluție standard de lucru, cu un conținut de 0,1 µg Pb/ml. 6. Triton-X, 5% în apă bidistilată.

Parametrii aparatului

1. Lungimea de undă : 283,3 nm
2. Fantă : 7
3. Curent de încălzire a lămpii de plumb : 8 mA
4. Gaz purtător : argon (1,8 litri/minut)
5. Atenuarea înregistratorului : 1/10
6. Viteza hîrtiei de înregistrare : 10 mm/minut
7. Programul de lucru :

	Temperatura °C	SK°	Timp (secunde)
Uscare	118	40	15
Calcinare	400	101	30
Atomizare	2 040	500	10

Observație : nu este absolut necesară folosirea compensatorului cu deuteriu.

Recoltarea probelor

Se recoltează urina, o singură emisiune (spot) sau se colectează urina de 24 ore, în vase de teflon, polietilenă (de preferință) sau în vase de sticlă bine spălate cu detergent, apă, acid azotic 10% și multă apă bidistilată sau deionizată.

Se recoltează sîngele prin puncție venoasă și se introduce în vase de teflon, polietilenă (de preferință) sau de sticlă, spălate și deplumbizate ca mai sus, conținînd 100 mg florură de sodiu.

Modul de lucru

Urină : într-o eprubetă de centrifugă cu dop, se introduc 3 ml urină, 0,5 ml tampon, 0,1 ml soluție PDTC-NH_4(Na), 1 ml soluție MIBK și se agită timp de 2 minute cu un agitator. Se centrifughează 10 minute la o turație de 3 500 rot./minut. O parte din supernatantul de MIBK se introduce în vase cu capac (de preferință de polietilenă). Din această soluție se injectează 10 µg, în atomizor. În cazul concentrațiilor mari (peste 200 µg·Pb/litru) se fac diluții, ale extrasului cu MIBK.

În paralel cu probele se efectuează probe martor și etalon cu 20 µg Pb/litru (în cazul urinelor normale) sau cu 100 µg Pb/litru (în cazul urinelor cu concentrații mai mari), care se prelucrează identic cu probele. Este recomandabil ca periodic să se introducă în atomizor probe etalon.

Sînge : într-o eprubetă se introduc 2,5 ml sînge, 0,5 ml soluție triton-X 5%, 0,5 ml PDTC-NH_4(Na) 2% și 2,5 MIBK.

În continuare se procedează ca în cazul urinii.

Scanned with OKEN Scanner

Calcularea și exprimarea rezultatelor

În calcul se ia în considerare semnalul obținut pentru proba etalon (h_e) și pentru proba martor (h_m) și se aplică următoarea relație :

$$C_x = \frac{h_x - h_m}{h_e - h_m} \cdot C_e$$

(μg Pb/litru urină sau μg Pb/100 ml sînge)

în care :

C_x = concentrația probei, exprimată în μg/litru urină sau μg Pb/100 ml sînge ;

C_e = concentrația etalonului, exprimată în μg Pb/litru urină sau μg Pb/100 ml sînge ;

h_x = mărimea semnalului probei ;

h_e = mărimea semnalului etalonului,

h_m = mărimea semnalului martorului.

Interpretarea rezultatelor

În mod normal se elimină în urină pînă la 60 μg plumb/24 ore și pînă la 50 μg plumb/100 ml sînge, la persoanele fără expunere profesională. Valori peste aceste limite indică o impregnare a organismului cu plumb.

F. **Determinări biochimice**

În intoxicația saturnină este perturbată și biosinteza porfirinică, de aceea sînt necesare (în afară de analizele toxicologice) și unele determinări biochimice care pun în evidență această perturbare și anume : determinarea porfirinelor urinare, a porfobilinogenului, a acidului delta-aminolevulinic și a activității delta-aminolevulinic-dehidrazei.

1. *Metodă spectrofotometrică pentru porfirinele urinare*

Principiu

Soluțiile de porfirine absorb puternic în zona spectrală 396—410 nm, fiecare tip de porfirină avînd o bandă îngustă, caracteristică. Coeficienții de absorbție molară ai fiecărui tip de porfirine sînt stabiliți în condiții definite. Pe baza acestor coeficienți se pot calcula concentrațiile de porfirine din soluții după măsurarea extincției la lungimea de undă specifică.

Porfirinele se extrag cu solvenți adecvați, pentru a fi, pe cît posibil, separate și purificate. În extractele din urină există totuși și unele impurități. Pentru corectarea absorbției datorită impurităților, se măsoară extincția la maximul datorit porfirinelor, ca și extincțiile de două lungimi de undă, simetrice față de acest maxim, la care porfirinele nu mai absorb. Se elimină, prin diferență, absorbția substanțelor interferente.

Formula de corecție este următoarea :

$$E\ cor. = \frac{2\ Emax - (E\ 380 + E\ 430)}{K}$$

în care :

E max = extincția maximă măsurată la maximul de extincție ;

E 380 și E 430 = extincțiile măsurate la 380 și 430 nm ;

K = factor de proporționalitate experimental, care este :

— pentru coproporfirină în HCl 0,1 N, K = 1,835

— pentru uroporfirină în HCl 0,5 N, K = 1,844.

Măsurînd extincțiile în aceste condiții, în cuva de 1 cm, se obține pentru :

1 μg coproporfirină/ml, E cor. = 0,667
1 μg uroporfirină/ml, E cor. = 0,653

de unde rezultă formula practică de calcul :

2 E max — (E 380 + E 430)·817 = μg coproporfirină/litru
2 E max — (E 380 + E 430)·831 = μg uroporfirină/litru

Reactivi

1. Acid acetic glacial. 2. Eter etilic p.a. 3. Acetat de etil p.a. 4. Acid clorhidric, 0,1 N și 0,5 N. 5. Iod, soluție 0,1 N. 6. Tiosulfat de sodiu, soluție 0,1 N.

Recoltarea probelor

Probele de urină se colectează în recipiente perfect curate, învelite în hîrtie neagră, în care se găsesc 5 ml toluen sau 5 ml soluție de timol 10% în izopropanol, pentru conservare. Este absolut necesară păstrarea probelor la adăpost de lumină și nefermentate, deoarece porfirinele se degradează foarte ușor.

Modul de lucru

Extragerea coproporfirinelor. Se pipetează într-o pîlnie de separare de 100 ml, 5 ml urină și 1 ml acid acetic glacial. Dacă este o probă de urină proaspăt emisă (de cîteva ore), se oxidează întîi porfirinogenii în porfirine, adăugînd 5 picături soluție de iod, agitînd și înlăturînd apoi excesul de iod cu 10 picături de soluție de tiosulfat. Dacă este o probă din urina colectată timp de 24 ore, se renunță la oxidare, deoarece, în timp, porfirinogenii se oxidează spontan. Se adaugă 30 ml eter etilic și se agită energic 3 minute. Coproporfirina se extrage în eter, uroporfirina rămîne în faza apoasă. După separarea completă a fazelor, se trece urina în a doua pîlnie de separare. Eterul rămas în prima pîlnie se spală de 3 ori cu cîte 5 ml apă, apele de spălare reunindu-se cu urina din pîlnia a doua.

Eterul se extrage cu porțiuni succesive de cîte 1 ml acid clorhidric 0,1 N agitînd cîte un minut. Dacă primul extract apare incolor, sînt suficiente 4 extracții. Extractele acide se trec, pe rînd, cantitativ, într-o eprubetă gradată și se completează volumul la 5 ml cu HCl 0,1 N. Dacă primul ml de extract apare colorat în roz (concentrație mare de porfirine), se prelungește extracția, utilizînd 9 porțiuni a cîte 1 ml HCl 0,1 N, iar volumul final se aduce la 10 ml.

Extragerea uroporfirinelor. În pîlnia a doua, în care s-a adunat urina (extrasă cu eter) și apele de spălare, se adaugă 30 ml acetat de etil și se agită un minut. După separarea fazelor, se elimină faza apoasă. Acetatul de etil se spală de două ori cu cîte 5 ml apă, care se elimină. Se extrage acetatul de etil cu porțiuni succesive de 1 ml HCl 0,5 N (pînă la 5 sau la 10 ml), ca la coproporfirine.

Dozare. Extractele obținute se trec în cuva de 1 cm și se măsoară extincțiile, față de apă, la 380 nm (E 380), apoi se caută valoarea maximă de extincție între 396 și 410 nm (E max) și, în fine, la 430 (E 430). Extincția maximă (E max) se află în jurul a 401 nm pentru coproporfirine și 405 nm pentru uroporfirine.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Se calculează corecția și se înmulțește cu factorul corespunzător porfirinei și cu diluția (dacă volumul final VF este 5 ml, adică egal cu proba, VP, corecția de diluție nu mai este necesară, deoarece VF/VP = 1) :

$$\mu g \text{ coproporfirine/litru urină} = 2\ E\ max - (E\ 380 + E\ 430) \cdot \frac{VF}{VP} \cdot 817$$

$$\mu g \text{ uroporfirine/litru urină} = 2\ E\ max - (E\ 380 + E\ 430) \cdot \frac{VF}{VP} \cdot 831$$

Observație

Atît probele, pînă la extracție, cît și extractele acide trebuie ferite în special de lumină puternică.

Interpretarea rezultatelor

Valorile normale sînt : pînă la 150 μg/24 ore pentru coproporfirine și pînă la 25 μg/24 ore pentru uroporfirine. Valorile superioare acestora, trebuie considerate ca indice posibil de tulburare metabolică și corelate cu alte determinări toxicologice și biochimice.

2. *Metoda de separare și dozare spectrofotometrică a porfobilinogenului (PBG) și acidului delta-aminolevulinic (ALA).*

Principiu

Se separă porfobilinogenul (PBG) reținîndu-l pe o coloană de schimbători de ioni anionici, apoi acidul delta-aminolevulinic (ALA), reținîndu-l pe o coloană cationică. PBG se dozează în eluatul coloanei anionice, măsurînd extincția produsului format cu p-dimetilaminobenzaldehida (reactiv Ehrlich). ALA eluat din coloana cationică, se transformă întîi într-un pirol, 2-metil-3-acetil-4-(3-propionic)pirol, tratînd eluatul cu acetil-acetonă. Se măsoară apoi extincția produsului format, cu reactiv Ehrlich.

Reactivi

1. Acetat de sodiu, soluție 2 M (272 g acetat de sodiu crist. în 1 000 ml apă) și soluție 1 M (136 g în 1 000 ml apă). 2. Hidroxid de sodiu 1 N (40 g NaOH în 1 000 ml apă). 3. Acid clorhidric 1 N (HCl d = 1,19 diluat 1 : 10). 4. Acid acetic, soluție 1 N (61 ml acid acetic glacial în 1 000 ml apă) și 0,2 N (soluție 1 M diluată 1 : 5). 5. Tampon acetat pH 4,6 : se dizolvă 68 g acetat de sodiu crist. în 350 ml apă, se adaugă 28,5 ml acid acetic glacial și se aduce la 500 ml cu apă. 6. Acetil-acetonă (2,4-pentandionă). 7. Rășină anionică Dowex 2-X_8, granulație 200—400. 8. Rășină cationică Dowex 50-X_8, granulație 200 —400 (granulația indicată este indispensabilă pentru obținerea rezultatelor corecte). 9. Reactiv Ehrlich : se dizolvă 1 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 30 ml acid acetic glacial, se adaugă 8 ml acid percloric 70% și se completează cu acid acetic glacial la 50 ml (se conservă numai 24 ore la frigider).

Prepararea coloanelor de rășini

Se utilizează corpuri de seringă din material plastic de 10 ml, așezate într-un stativ simplu construit din două fîșii de placaj (carton), suprapuse la distanță de 10 cm și prevăzute cu orificii pentru seringi. La fundul seringii se așază un disc de hîrtie de filtru, peste care se introduce suspensia de

Scanned with OKEN Scanner

răşină pînă la formarea unui strat de 1,5 cm înălţime (corespunde cu gradaţia 2 ml pe seringă). Peste stratul de răşină se aşază încă un disc de hîrtie de filtru.

Condiţionarea răşinilor

Într-o coloană de sticlă de 4—5 cm diametru şi 50 cm lungime, prevăzută cu un tampon mic de vată la tubul de scurgere, se introduc 100 g răşină suspendată cu apă.

Răşinile anionice : După scurgerea apei, se trece prin coloană HCl 1 N (de aproximativ 3 ori volumul răşinii) apoi apă, cît este necesar pentru ca efluentul să nu mai fie acid (hîrtie indicator). Se trec 5 volume de acetat de sodiu 2 M, apoi acetat de sodiu 1 M, pînă cînd efluentul nu mai conţine Cl^- (testare cu $AgNO_2$). Se trec 5 volume de apă prin coloană şi se transvazează răşina condiţionată într-un flacon (preferabil din polietilenă), putîndu-se păstra indefinit la frigider, sub un strat de apă.

Răşinile cationice : Se tratează în aceeaşi coloană, întîi cu 2 volume NaOH 1 N, apoi cu apă pînă la neutralizarea efluentului. Se trec apoi 5 volume HCl 1 N şi din nou apă, pînă la neutralizarea efluentului. Se păstrează la frigider, sub un strat de apă.

Răşinile întrebuinţate se colectează în flacoane cu apă şi se recondiţionează după procedeul descris anterior.

Recoltarea probelor

Este preferabil să se lucreze pe urini proaspete (maximum 8 ore de la recoltare). Dacă trebuie totuşi să se păstreze (pînă la 36 ore), se acidifică probele la pH sub 6,0, prin adăugare, îndată după recoltare, de 0,1 ml acid acetic glacial la 10 ml urină. Este indicat să se lucreze pe urina din cursul dimineţii, nu însă pe prima urină (care este urina de noapte).

Separarea pe coloane

Se aşază coloanele perechi, una peste alta : sus coloana anionică şi jos coloana cationică. Se introduc 10 ml apă în coloana de sus şi se lasă să treacă complet prin ambele coloane. Se pipetează 1 ml urină în coloana de sus şi se lasă să treacă complet prin ambele coloane. Se trec, de 3 ori, cîte 10 ml apă prin coloane. Toate efluentele sînt îndepărtare.

Eluarea şi dozarea PBG

Coloanele anionice pe care s-a reţinut PBG se aşază deasupra unei eprubete gradate a 10 ml. Se trec prin coloană 4 ml acid acetic 1 M, apoi 3 ml acid acetic 0,2 M. După fiecare adăugare de lichid se lasă să dreneze complet coloana. Se completează volumul la 10 ml cu apă.

Se pipetează 2 ml din acest efluent într-o eprubetă, se adaugă 2 ml reactiv Ehrlich, se amestecă şi după 5 minute se măsoară extincţia probelor (E—PBG) faţă de un martor (format din 2 ml apă şi 2 ml reactiv Ehrlich) la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm, în cuvă de 1 cm.

Eludarea şi dozarea ALA

Coloanele cationice pe care s-a reţinut ALA se aşază deasupra unei eprubete gradate a 10 ml şi se eluează cu 7 ml acetat de sodiu 1 M. Se completează volumul la 10 ml cu tampon acetat, se adaugă 0,2 ml acetil-acetonă, se amestecă şi se menţine 10 minute în baie la fierbere. Se răceşte la robinet.

Scanned with OKEN Scanner

Se pipetează 2 ml din acest lichid într-o eprubetă, se adaugă 2 ml reactiv Ehrlich, se amestecă și după 15 minute se măsoară extincția probelor (E —DAL) față de un martor (format din 2 ml acetat de sodiu și 2 ml reactiv Ehrlich), la spectrofotometru, $\lambda = 553$, în cuvă de 1 cm.

Calcul

Deoarece separarea PBG și ALA este foarte bună în condițiile metodei și, de asemenea, reacția cu reactiv Ehrlich este bine reproductibilă, se poate face calculul pe baza coeficienților de extincție molari (E_M), masele moleculare fiind $M_{PBG} = 226{,}26$ și $M_{ALA} = 131{,}15$, volumul final, VF = 4,0 ml și volumul probei, VP = 0,2 ml :

$$E_M - PBG = 3{,}6 \cdot 10^4 \text{ și } E_M - ALA = 5{,}5 \cdot 10^4$$

$$\text{mg PBG/litru urină} = E - PBG \cdot 126$$

$$\text{mg ALA/litru urină} = E - ALA \cdot 47{,}6$$

Interpretarea rezultatelor

Valorile normale sînt : 0—2 mg/urină din 24 ore pentru PBG și 0,1—5,7 mg/urină din 24 ore pentru ALA.

3. *Metodă rapidă de dozare pentru acidul delta-aminolevulinic (ALA)*

Pentru controlul în serii mari al muncitorilor expuși la plumb, este utilă o metodă rapidă, care nu necesită separare pe schimbători de ioni.

Principiu

Acidul delta-aminolevulinic se condensează cu acetil-acetona, rezultînd un compus pirolic, care cu reactivul Ehrlich dă un produs roșu, colorimetrabil.

Reactivi

1. Soluție de diluare (100 ml soluție acetat de sodiu 0,5 M în care se suspendă 0,25 g cărbune medicinal). 2. Acetil-acetonă. 3. Reactiv Ehrlich (v. metoda precedentă). 4. Soluție standard stoc : se dizolvă 6,4 mg acid delta-aminolevulinic în 100 ml apă (1 ml = 50 μg). Soluția se conservă pînă la 3 luni în frigider. 5. Soluția standard de lucru : se diluează soluția standard stoc în proporție de 1 : 5 (1 ml = 10 μg). Se conservă în frigider timp de 3 zile.

Modul de lucru

La 1 ml urină (din urina de 24 ore) se adaugă 9 ml soluție de diluare, se agită și se filtrează. Se măsoară în două eprubete, E_P (probă) și E_M (martor), cîte 3 ml filtrat. În E_P se adaugă 0,1 ml acetil-acetonă. Ambele eprubete se mențin 20 minute în baia de apă la fierbere. Se răcesc și se adaugă în fiecare cîte 3 ml reactiv Ehrlich.

După 15 minute se măsoară extincția probei la spectrofotometru la $\lambda = 553$ nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu martorul.

În paralel se prelucrează o serie de standarde cu concentrația cuprinsă între 1 și 10 μg ALA ml. Se stabilește o curbă, față de care se raportează extincția obținută la probă, rezultînd concentrația C a acidului delta-aminolevulinic, în μg, în probă.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg ALA la litru urină sau la urina din 24 ore:

$$\mu g \text{ ALA/litru urină} = \frac{C \cdot 1\,000}{0,3}$$

$$\mu g \text{ ALA/24 ore} = \frac{C \cdot V}{0,3}$$

în care:

C = concentrația ALA din probă, în μg;

V = volumul de urină recoltat în 24 ore, în ml.

4. *Metoda de determinare a activității delta-aminolevulinic-dehidrazei (ALA-dehidraza)*

Principiu

Activitatea ALA-dehidrazei se determină prin dozarea spectrofotometrică a porfobilinogenului din sînge, înainte și după incubarea sîngelui total cu acid delta-aminolevulinic, ca substrat.

Reactivi

1. Acid delta-aminolevulinic 0,01 M. Se dizolvă 0,1311 g acid delta-aminolevulinic sau 0,1676 g acid delta-aminolevulinic clorhidrat în 80 ml apă bidistilată. Se ajustează pH-ul la 7 cu carbonat acid de sodiu și se completează la 100 ml cu apă bidistilată. Se poate păstra maximum 3 zile la frigider. 2. Reactiv Ehrlich. Se dizolvă 1 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 30 ml acid acetic glacial, se adaugă 8 ml acid percloric 70% și se completează la 50 ml cu acid acetic glacial. Se poate păstra maximum 7 zile la frigider. 3. Soluție deproteinizantă. Se dizolvă 10 g acid tricloracetic în cîțiva mililitri apă bidistilată, se adaugă 2,7 g clorură mercurică și se completează la 100 ml cu apă bidistilată.

Modul de lucru

În două eprubete de centrifugă M(martor) și P(probă) se introduc:

Eprubeta/reactivi	*M*	*P*
Sînge (recoltat prin puncție venoasă pe heparină) (ml)	0,2	0,2
Apă bidistilată (ml)	1,3	1,3
se omogenizează, se introduc într-o baie-termostat la 37°C timp de 10 minute pentru hemolizare, apoi se adaugă:		
Acid delta-aminolevulinic (ml)	—	1
Acid tricloracetic (ml)	1	—
se agită, apoi se adaugă:		

Eprubeta/reactivi	*M*	*P*
Acid delta-aminolevulinic (ml)	1	—
Se omogenizează, se introduc în baia-termostat la 37°C timp de 60 minute pentru incubare, apoi se adaugă :		
Acid tricloracetic (ml)	—	1
se centrifughează la 3 000 rot/min. timp de 10 minute		

Din eprubeta P se iau cîte 1 ml supernatant care se introduc în două eprubete, peste care se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich, se omogenizează și, după exact 5 minute, se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm, în cuva de 1 cm față de un blanc al reactivilor (1 ml apă bidistilată + 1 ml reactiv Ehrlich). Se procedează identic cu cîte 1 ml supernatant din eprubeta M.

Calcul

Rezultatele se exprimă în unități ALA-dehidrază/litru eritrocite :

Unități ALA-dehidrază/l eritrocite =

$$12{,}5 \times 1\,000 \times \frac{Ep - Em}{\%\ hem.}$$

în care :

Ep = extincția probei din eprubeta P

Em = extincția martorului din eprubeta M

hem. = hematocrit

Interpretarea rezultatelor

Se consideră ca valori normale pentru activitatea ALA-dehidrazei 25 unități/litru de eritrocite.

Delta-aminolevulinic-dehidraza intervine în biosinteza hemului și anume, catalizează reacția de formare a porfobilinogenului (PBG), precursor al nucleului porfirinic. Scăderea activității ALA-dehidrazei sub valorile normale, indică, precoce, perturbări ale biosintezei porfirinice, ca urmare a expunerii organismului la plumb.

II.2.3. BISMUTUL

A. **Izolare**

Bismutul din produse biologice sau alte produse se eliberează prin mineralizare sulfonitrică sau cu clor.

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu :

Scanned with OKEN Scanner

1. *Reactiv Bettendorf* (clorură stanoasă în mediu alcalin) : se depune un precipitat negru de Bi metalic :

$$3[Sn(OH)_4]^{2-} + 2\ Bi^{3+} + 6\ OH^- = 2\ Bi + 3[Sn(OH)_6]^{2-}$$

2. *Cinconină (chininā) în prezența iodurii alcaline și în mediu de HNO_3 diluat :* apare un precipitat galben-portocaliu de BiI_4-cinconină *(reacția Feigl).*

3. *Bismutiol* (2,5 dimercapto-1,3,4-tiodiazol) : apare un precipitat roșu.

II.2.4. STIBIUL

A. Izolare

Stibiul, sub formă de pulberi sau aerosoli de minereuri (stibină etc.), este reținut din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Stibiul din produse organice necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică, prin mineralizare. Din materialul minerlizat, se izolează sub formă de $SbCl_3$, cu ajutorul HCl la cald. Triclorura de stibiu hidrolizează la tratare cu apă la SbOCl, iar prin hidroliză mai avansată, trece în acid metastibios, $HSbO_2$, acid stibios, $Sb(OH)_3$, apoi în trioxid de stibiu, Sb_2O_3. De asemenea, pentaclorura de stibiu, $SbCl_5$, hidrolizează la oxiclorură stibică, SbO_2Cl, care trece ușor, la cald, în acid stibic, H_3SbO_4. Această proprietate a clorurilor de stibiu de a hidroliza sub formă de precipitate de oxicloruri, care rămîn pe filtru, poate determina pierderi din materialul mineralizat. De aceea precipitatul de pe filtru se spală cu o soluție de acid tartric, care, prin formarea emeticului, împiedică hidroliza.

B. Determinare rapidă din aer

Hidrogenul stibiat, H_3Sb, se determină din aer prin aspirare cu :

1. *Soluție alcoolică de $Hg(CN)_2$* : precipită Hg. În aceleași condiții, H_3As dă un precipitat roșu-brun nestabil, care se descompune, după cîteva ore, în Hg, As_2O_3 și HCN.

2. *Soluție alcoolică de NaOH* : se depun flocoane negre de Sb. În aceleași condiții H_3As formează arsenit.

3. *Hîrtie îmbibată cu $HgCl_2$ și fixată într-o pîlnie Palmer :* se formează o pată cenusie-brună de Sb metalic.

C. Identificarea simultană a Sb și As

Amestecul de H_3Sb și H_3As se barbotează în soluție de azotat de argint, cînd H_3As trece în acid arsenios, iar H_3Sb trece în stibiură de argint :

$$H_3As + 6\ AgNO_3 + 3\ H_2O = H_3AsO_3 + 6\ Ag + 6\ HNO_3$$

$$H_3Sb + 3\ AgNO_3 = Ag_3Sb + 3\ HNO_3$$

Se separă prin filtrare Ag_3Sb și se calcinează cu nitrat de potasiu și carbonat de potasiu, cînd trece în stibiat de potasiu. După acidulare se separă Sb ca sulfură.

D. Identificare din produse biologice sau alte produse

1. *Reacția cu rodamină B :* soluția clorhidrică de analizat se tratează cu 2—3 cristale de $NaNO_2$ pentru a trece Sb^{3+} la Sb^{5+} și se încălzește la fier-

Scanned with OKEN Scanner

bere pînă la îndepărtarea vaporilor nitroși (se poate adăuga, în același scop, uree). Soluția de Sb^{5+} se tratează cu cîteva picături de rodamină B soluție 0,05%, cînd se obține o colorație violetă-albastră, extractibilă în benzen.

2. *Cu reactivul Bougault* (v. Arsenul) nu se observă, spre deosebire de arsen, o colorație sau precipitat de Sb elementar.

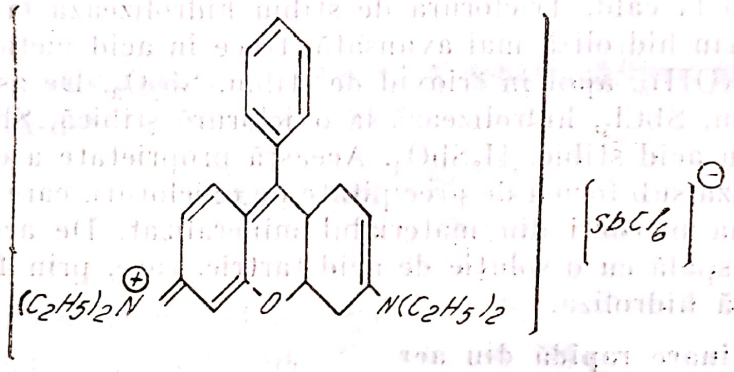
E. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru aer*

Principiu

Stibiul pentavalent formează cu rodamina B un complex colorat care, după extragere selectivă într-un solvent organic (de exemplu, benzenul) este determinat spectrofotometric. Pentru a se putea realiza reacția de culoare, stibiul din proba recoltată trebuie oxidat la forma pentavalentă fie cu sulfat ceric în prezența acidului clorhidric, fie cu acid percloric (în special pentru stibiul din materialul biologic).

Complexul colorat are, după Feigl, următoarea structură :



Reactivi

1. Soluție absorbantă. Se dizolvă 60 g clorură mercurică în acid clorhidric 6 N și se aduce la 1 000 ml cu acid clorhidric 6 N. 2. Acid clorhidric soluție 6 N. Se diluează 184 ml HCl concentrat cu apă distilată, la 1 000 ml ; 3. Sulfat de ceriu soluție 0,1 N. Se dizolvă 33 g sulfat ceric în acid sulfuric 3% și se aduce la 1 000 ml ; 4. Hidroxilamină hidroclorică, soluție 1% ; 5. Rodamină B 0,2% (soluția se filtrează înainte de întrebuințare) ; 6. Benzen p.a. ; 7. Soluție standard stoc. Se încălzesc ușor, pînă la dizolvare, 0,1000 g stibiu metalic cu 25 ml acid sulfuric concentrat. Se răcește și se aduce la 1 000 ml cu apă distilată (1 ml = 100 μg stibiu) ; 8. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 10 (1 ml = 10 μg Sb).

Recoltarea probelor

Se aspiră 10—20 litri aer, cu un debit de 2 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevede încă unul, cu 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a recolta aer prin el, constituind proba martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitorului într-un flacon Erlenmeyer de 100 ml. Se spală absorbitorul cu 2 ml HCl 6 N care se aduc

în același Erlenmeyer. Se completează volumul pînă la 15 ml HCl 6 N. Se adaugă 0,5 ml soluție de sulfat de ceriu și se lasă în repaus 1 minut. Se barbotează aer curat în Erlenmeyer timp de 5—10 secunde pentru a îndepărta clorul liber produs de sulfatul ceric. Se adaugă 3 picături de soluție de hidroxilamină, 5 ml HCl 6 N și se barbotează din nou aer curat timp de 10 secunde, după care se adaugă imediat 1 ml soluție rodamină B și se agită. Se transvazează soluția într-o pîlnie de separare de 100 ml, se spală flaconul Erlenmeyer cu 5 ml benzen, care se adaugă în pîlnia de separare. Se introduc încă 20 ml benzen și se agită energic timp de 1 minut. Se îndepărtează, după separarea fazelor, faza apoasă și o porțiune din faza benzenică. Restul fazei benzenice se centrifughează pentru a îndepărta urmele de apă. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 565$ nm, în cuva de 1 cm, față de proba martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 10 μg stibiu prin puncte din 0,2 în 0,2 (se iau 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ml soluție standard de lucru, se completează la 10 ml cu soluție de clorură mercurică, se adaugă 5 ml HCl 6 N și 0,5 ml sulfat ceric și se continuă ca la probe). Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a stibiului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Sb/m³ aer :

$$\text{mg Sb/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația stibiului, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Prin această metodă se poate determina și H_3Sb, modul de recoltare și de lucru fiind identice :

$$\text{mg } H_3Sb/\text{m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1{,}025$$

în care :

1,025 = factorul de corespondență între Sb și H_3Sb.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru sînge și urină*

Principiu

Același ca la metoda precedentă.

Reactivi

1. Acid sulfuric d = 1,84. 2. Acid azotic d = 1,42. 3. Acid percloric concentrat (60%) ; 4. Benzen p.a ; 5. Acid clorhidric soluție 6 N. 6. Rodamină B, soluție 0,02%. 7. Acid ortofosforic 3 N. Se aduc 70 ml H_3PO_4 de 85% la 1 000 ml cu apă ; 8. Soluție standard stoc. Se încălzesc ușor, pînă la dizolvare, 0,1000 g stibiu metalic cu 25 ml acid sulfuric concentrat. Se răcește și se aduce la 1 000 ml cu apă distilată (1 ml = 100 μg stibiu). 9. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 1 μg stibiu).

Modul de lucru

Se introduc într-un balon Kjeldhal 50 ml urină sau 15 ml sînge și se adaugă, sub nișă, 5 ml acid sulfuric concentrat și 5 ml acid azotic concentrat. Se în-

Scanned with OKEN Scanner

călzește cu atenție, mai ales în cazul sîngelui (țesuturilor), cînd există riscul spumării abundente, și deci a pierderilor de produs. După dispariția vaporilor nitroși, se intensifică încălzirea. Dacă produsul de mineralizare se înnegrește, se mai adaugă acid azotic și se lasă să se degaje vaporii nitroși. Se adaugă acid azotic pînă la decolorare și apariția de vapori albi de SO_3. La soluția incoloră se adaugă 5 picături de acid percloric și se încălzește puternic, pînă la apariția vaporilor albi de SO_3. Soluția răcită trebuie să fie incoloră. După răcire, se adaugă 3 ml apă distilată și se încălzește puternic pînă la apariția vaporilor de SO_3, după care se răcește. Soluției răcite i se adaugă, după răcire cu gheață, 5 ml HCl 6 N, 8 ml acid fosforic 3 N și, imediat, 5 ml soluție de rodamină B. Se trece această soluție într-o pîlnie de separare, se adaugă 10 ml benzen și se agită puternic de 150 ori. Se elimină faza apoasă, iar fazei benzenice, după centrifugare pentru îndepărtarea urmelor de apă, i se citește extincția, la spectrofotometru, la $\lambda = 565$ nm, în cuva de 1 cm, față de un blanc al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 10 μg, prin puncte din 2 în 2 (se iau 0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ml soluție standard de lucru și se prelucrează în condițiile probei, inclusiv mineralizarea). Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a stibiului în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg Sb/1 000 ml urină sau μg Sb/100 ml sînge :

$$\mu g \text{ Sb/1 000 ml urină} = \frac{C}{A} 1\,000$$

$$\mu g \text{ Sb/100 ml sînge} = \frac{C}{A} 100$$

în care :

C = concentrația stibiului, în μg ;
A = volumul de urină (sînge) luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

La persoanele neexpuse nu se decelează Sb în produsele biologice.

II.2.5. STANIUL

A. Izolare

Staniul din produse biologice și alte produse se eliberează prin mineralizare sulfonitrică sau cu clor.

B. Identificare

Pe soluția de analizat se execută reacțiile :

1. *Reacția Bellendorf* : Hg^{2+} se reduce la Hg metalic în prezența Sn^{2+}.

2. *Reacția „purpura lui Cassius"* : sarea stanoasă reduce clorura de aur, cu formare de dioxid de staniu, care rămîne în soluție sub formă coloidală și adsoarbe aurul, aflat în soluție ca un sol de culoare purpurie.

3. *Reacția cu brucină oxidată cu acid azotic* : $SnCl_2$ o transformă în cacotelină, de culoare violetă.

Scanned with OKEN Scanner

II.2.6. CUPRUL

A. **Izolare**

Cuprul și compușii săi sub formă de aerosoli și pulberi sînt reținuți din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Cuprul din produse biologice sau alte produse necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare (cu acizi sau calcinare).

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Ferocianură de potasiu 5%* : apare un precipitat roșu-brun de ferocianură cuprică, solubil în amoniac cu dezvoltarea culorii albastre. Sensibilitate : 10 μg/ml.

2. *Piridină și sulfocianură 20%* : cu piridina se formează complexul $[CuPy_2]^{2+}$ albastru, care la adaus de KSCN trece în colorație sau precipitat verde mazăre, extractibil în cloroform (reacția Spacu). Sensibilitate : 10 μg/ml.

3. *Reactiv Montequi B*, tetrasulfocianmercuriat de amoniu, $[Hg(SCN)_4](NH_4)_2$: apare un precipitat brun-verde. Reactivul se prepară din 8 g $HgCl_2$ și 9 g NH_4SCN în 100 ml apă.

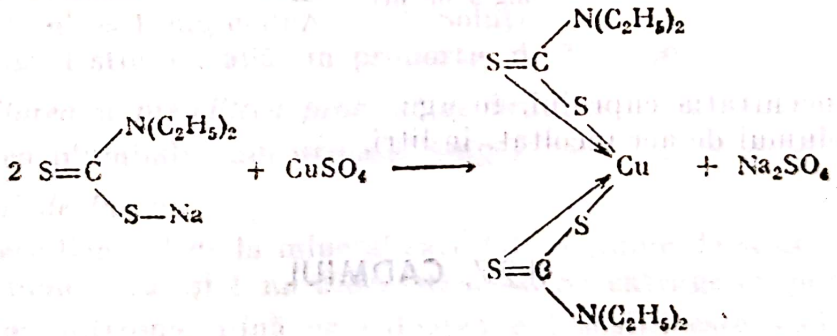
4. *Ditizonă* (0,05% în cloroform) : în mediu slab acid se formează ditizonatul de cupru, violet.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Sărurile de cupru reacționează cu dietilditiocarbamatul de sodiu, dînd dietilditiocarbamatul de cupru de culoare galbenă, colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 1,5 μg/ml. Metoda nu este specifică : interferă plumbul (care însă poate fi eliminat), fierul, manganul și zincul, în cazul cînd se află în cantități de peste 3 mg.

Reactivi

1. Acid azotic, soluție 3% v/v. 2. Acid sulfuric, soluție 5% v/v. 3. Amoniac, soluție 20% v/v. Se prepară prin diluarea 1 : 5 a amoniacului 25%, d = 0,9. 4. Dietilditiocarbamat de sodiu, soluție 0,1%. 5. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,3920 g sulfat de cupru, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 100 ml apă (1 ml = = 1 mg cupru). 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg cupru).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 100 litri aer, cu un debit de 10—15 litri/minut, printr-un dispozitiv filtrant cu 2 rondele de hîrtie de filtru suprapuse sau printr-o alonjă cu vată de sticlă.

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, care se transportă în teren, fără a se aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Filtrul cu proba sau vata din alonjă se extrag într-un pahar cu 20 ml acid azotic. Se trece lichidul de extracție într-un pahar mic sau într-o capsulă, se spală filtrul sau vata cu încă 10 ml acid azotic care se aduc tot în pahar sau capsulă și se evaporă la sec pe baia de nisip. Peste reziduu se adaugă 0,1 ml acid sulfuric, 2 ml apă și se filtrează printr-un filtru mic, umectat, într-o eprubetă gradată, spălîndu-se capsula și filtrul cu apă, pînă la un volum final de 10 ml. În eprubetă se adaugă 3 ml amoniac, 2 ml dietilditiocarbamat de sodiu și se amestecă.

În paralel se lucrează martorul, la fel ca și probele.

După 15 minute se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 470$, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg cupru, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a cuprului în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg cupru/m³ aer:

$$\text{mg 3 m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația cuprului, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

II.2.7. CADMIUL

A. **Izolare**

Cadmiul și compușii săi sub formă de aerosoli și pulberi sînt reținuți din aer în soluții absorbante (acizi minerali diluați) sau pe dispozitive filtrante. Cadmiul din produse biologice și alte produse (alimente contaminate etc.) necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare (cu acizi sau calcinare).

B. **Identificare**

1. *Hîrtie impregnată cu difenilcarbazidă* (3% în etanol); la tratare cu 1—2 picături de soluție de analizat și expunere la vapori de amoniac, se formează o pată violetă. Sensibilitate: 1 μg.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Iodură de potasiu 10% (1 vol.) și sulfat de brucină (sau chininā), 2%* (1 vol.): se adaugă cîteva picături de reactiv la soluția de analizat, cînd apare un precipitat gălbui de iodocadmiat de brucină (sau chininā).

3. *8-hidroxichinolină (oxină), 1,5% în acid acetic:* se adaugă cîteva picături de reactiv la soluția de analizat în mediu neutru, cînd apare un precipitat galben-portocaliu de oxinat de cadmiu.

C. Dozare din produse biologice

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Cadmiul formează cu ditizona un complex roșu, colorimetrabil. Alte metale interferente sînt eliminate prin extracții succesive, la pH-uri diferite și prin adăugare de complexanți (tartrat, cianură).

Reactivi

1. Tampon citrat, pH aproximativ 10. Se dizolvă 100 g acid citric în 30 ml apă și se adaugă amoniac, în porțiuni mici, răcind continuu, pînă la un pH de aproximativ 8,6 (viraj cu roșu de fenol). Se aduce cu apă la 250 ml și se demetalizează soluția, agitînd-o cu porțiuni succesive de ditizonă, soluție 0,05 în cloroform, pînă ce ditizona rămîne verde. Se spală cu 2 porțiuni de cîte 10 ml cloroform. Se adaugă 500 ml amoniac. 2. Ditizonă, soluție 0,01% în cloroform. 3. Acid azotic d = 1,42, diluat 1 : 100. 4. Soluție de complexanți. Se dizolvă 10 g tartrat de sodiu și potasiu (sare Seignette) în 250 ml apă. Se amestecă cu 250 ml amoniac și se adaugă 0,25 g cianură de potasiu. 5. Hidroxilamină hidroclorică, soluție 10% adusă la pH 8,6 cu amoniac și demetalizată cu soluție de ditizonă. 6. Soluție de spălare: în 500 ml hidroxid de sodiu, soluție 2 N se adaugă 0,25 g cianură de potasiu și 10 g tartrat de sodiu și potasiu. 7. Soluție standard stoc: se dizolvă 0,2032 g clorură de cadmiu sau 0,2282 g sulfat de cadmiu în 100 ml acid azotic dil. (1 : 100) (1 ml = 1 mg cadmiu). 8. Soluție etalon de lucru: se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1 : 1 000 (1 ml = 1 μg cadmiu).

Recoltarea și pregătirea probelor de urină

(v. Dozarea plumbului din urină și sînge)

Modul de lucru

Se trece lichidul de la mineralizare într-o pîlnie de separare și se adaugă 25 ml tampon citrat și 1 ml hidroxilamină. Se extrage cu porțiuni succesive de 2—3 ml ditizonă, pînă ce culoarea extrasului este violacee-albăstruie. Extrasele cloroformice se trec în a doua pîlnie de separare, în care s-au pus 25 ml acid azotic 1 : 100. Se agită minimum 1 minut (faza cloroformică devine verde). Se elimină faza cloroformică și se adaugă în faza apoasă 5 ml soluție de complexanți și 1 ml hidroxilamină. Se extrage cu porțiuni succesive de 2 ml ditizonă (exact măsurate), care se trec în a treia pîlnie de separare, în care s-au pus 25 ml soluție de spălare și 1 ml hidroxilamină. Se extrage pînă ce culoarea fazei cloroformice este violetă palid, apoi se adaugă cloroform pînă la completarea volumului fazei cloroformice la 10 ml. Se agită cu soluția de spălare 30 secunde și, după separare, se filtrează faza cloroformică într-o eprubetă.

Scanned with OKEN Scanner

În paralel se lucrează un martor, la fel cu probele.

Se măsoară extincția la spectrofotometru la $\lambda = 500$, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 1 și 10 μg cadmiu, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus.

Valorile obținute pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a cadmiului în μg în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg cadmiu/litru urină:

$$\mu g \text{ cadmiu/litru urină} = \frac{C}{V_p} \cdot 1\,000$$

în care:

C = concentrația cadmiului, în μg;
V_p = volumul probei luate în lucru, în ml.

2. *Metoda spectofotometrică de absorbție atomică*

Principiu

Cadmiul, complexat cu sarea de amoniu a acidului pirolidinditiocarbonic, PDTC—NH_4, la pH 5—7, se extrage cu metilizobutilcetonă. Extractul organic se injectează în atomizator, determinîndu-i-se absorbția în comparație cu un etalon. Domeniul optim de lucru este de 0,01—0,1 μg Cd în cantitatea de probă introdusă în aparat.

Aparatură

1. Spectrofotometru de absorbție atomică de tipul Perkin-Elmer-300. 2. Atomizor HGA-72. 3. Înregistrator Hitschi-56. 4. Vortex-mixer. 5. Centrifugă Wifug. 6. Eprubete de centrifugă de tip Sovirel. 7. Pipete Eppendorf de 5; 10; 50; 100 μg.

Parametri aparatului

1. Lampă de cadmiu cu catod scobit-HVL: 6 mA
2. Curent de încălzire a lămpii de cadmiu: 9 mA
3. Lungimea de undă: 229 nm
4. Fanta: 7
5. Gaz purtător: argon, debit: 1,8 l/minut
6. Atenuarea înregistratorului: 1/10
7. Viteza hîrtiei de înregistrare: 10 mm/minut
8. Programul de lucru pentru HGA-72:

	Temperatura °C	SK°	Timp (secunde)
Uscare	110	38	15
Calcinare	350	86	30
Atomizare	1 600	332	15

Recoltarea probelor

Se recoltează urina, o singură emisiune (spot) sau se colectează urina de 24 ore, în vase de material plastic sau de sticlă, bine spălate cu detergent, apă, acid azotic 5% și multă apă bidistilată sau deionizată. Sîngele se recol-

Scanned with OKEN Scanner

tează cu o trusă individuală (sistem Venoject-Japonia), în tuburi heparinizate și se agită imediat pentru evitarea coagulării.

Probele se pot păstra în frigider maximum o săptămînă.

Modul de lucru

Urina : într-o eprubetă de centrifugă cu dop, se introduc 3 ml urină, se adaugă 0,2 ml soluție PDTC-NH_4 2% (extrasă în prealabil cu MIBK, de două ori) și se agită. După 10 minute se adaugă 1 ml MIBC (saturată cu apă bidistilată) și se agită puternic timp de 1 minut. Se centrifughează 10 minute la 3 000—4 000 rot/minut. Din supernatantul limpede se măsoară 5 ml și se injectează în atomizor.

În paralel se prelucrează 3 ml soluție standard cu un conținut de 20 μg cadmiu/l și un martor, în condiții identice cu probele.

Sînge : tuburile de sînge se agită bine cu ajutorul unui Vortex mixer, se scot dopurile și se măsoară 2 ml într-un tub Sovirel. Se adaugă 0,5 ml soluție Triton X 5% pentru hemoliză și se agită. Se lasă în repaus 30 minute. Se adaugă 0,5 ml PDTC 2%, se agită și apoi se extrag timp de 1 minut cu 2 ml MIBK saturată cu apă. În continuare se prelucrează identic cu proba de urină.

Calcul

În calcul se ia în considerare semnalul obținut pentru proba etalon (h_e) și pentru proba martor (H_m) și se aplică următoarea relație :

$$C_x = \frac{h_x - h_m}{h_e - h_m} \cdot C_e$$

în care :

C_x = concentrația probei, exprimată în μg/litru urină sau μg/100 ml sînge;

C_e = concentrația etalonului, exprimată în μg Cd/litru urină sau μg Cd/100 ml urină ;

h_x = mărimea semnalului probei ;

h_e = mărimea semnalului etalonului ;

h_m = mărimea semnalului martorului.

Observații

1. Toate recipientele cu care se lucrează (de la recoltare și pînă la injectare) trebuie să fie foarte bine spălate, încît să nu conțină urme de cadmiu. 2. Toți reactivii folosiți să fie „sine cadmium". 3. În atmosfera laboratorului unde se execută determinarea să nu fie urme de cadmiu.

Interpretarea rezultatelor

Cadmiul nu este un bioelement. La persoanele neexpuse se elimină în jur de 0,025 mg/litru urină, iar la persoanele expuse, se ating valori de peste 0,1 mg cadmiu/litru urină.

D. Testul de acid tricloracetic 3% pentru aprecierea proteinuriei cadmice

La persoanele expuse mai mult timp la cadmiu poate apărea o proteinurie cu o compoziție specifică, și anume : conținut bogat în globuline ; masă moleculară mică, ceea ce o diferențiază de proteinemia din alte afecțiuni. Pentru decelarea rapidă a proteinuriei cadmice se procedează astfel : într-o eprubetă de 16/160 mm se pipetează 5 ml acid tricloracetic 30%, apoi

Scanned with OKEN Scanner

5 ml urină. Se amestecă ușor și după 3 minute se observă stratul de precipitat. După grosimea stratului se apreciază : urme, pozitiv (+, ++, +++), sau, în absența precipitatului, negativ.

II.2.8. NICHELUL ȘI NICHELCARBONILUL

A. Izolare

Nichelul și compușii săi anorganici, sub formă de aerosoli și pulberi și nichelcarbonilul, sub formă de vapori, sînt reținuți din aer pe dispozitive filtrante sau în soluții absorbante. Nichelul din produse organice necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare.

B. Identificare

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Dimetilglioximă* (1% în alcool) : în mediu amoniacal se formează un complex roșu, extractibil în solvenți organici.

2. *Acid rubeanic* (1% în alcool) : se formează rubeanatul de Ni, complex de culoare albastră. Executată pe hîrtie de filtru, reacția are sensibilitatea de 0,05 μg nichel.

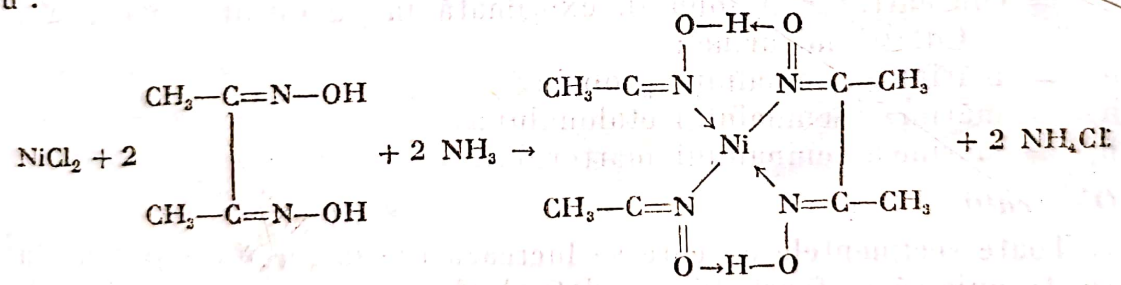
3. *Ferocianură de potasiu 5% :* pare un precipitat de ferocianură de Ni, verde deschis, solubil în amoniac conc.

C. Dozare din aer

1. *Metoda spectrofotometrică pentru nichel*

Principiu

Nichelul formează cu dimetilglioxima în mediu alcalin, un complex roșu :



Sensibilitatea metodei este de 0,2 μg/ml. Dimetilglioxima formează complecși colorați și cu alte metale (Fe, Cu, Co), însă interferența acestora este eliminată în condițiile metodei.

Reactivi

1. Albastru de timol, soluție apoasă 0,1% ; 2. Dimetilglioximă amoniacală : se dizolvă 0,1 g dimetilglioximă în 50 ml amoniac și se completează la 100 ml cu apă ; 3. Iod, soluție 0,1 N ; 4. Citrat de amoniu : se dizolvă 100 g acid citric în 100 ml apă și se adaugă, răcind sub robinet, 100 ml amoniac (se poate folosi și citrat de amoniu, soluție 10%) ; 5. Acid clorhidric, soluție 0,5 N și 0,1 N ; 6. Amoniac diluat 1 : 50 (din amoniac 25% v/v) ; 7. Cloroform ; 8. Soluție standard stoc : se dizolvă în 100 ml apă, 0,4785 g $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 ml = 1 mg Ni). 9. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu HCl 0,5 N în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg Ni).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 20 litri aer, printr-un dispozitiv filtrant cu hîrtie de filtru sau printr-o alonjă cu vată de sticlă.

În afară de dispozitivele de recoltare a probelor, se prevede încă unul, care se manipulează și se transportă în teren, fără a aspira aer prin el, constituind proba martor.

Pregătirea probelor

Filtrele sau vata din alonjă se extrag într-un pahar cu 10 ml HCl 0,5 N, încălzind moderat. Se filtrează într-un vasconic de 100 ml, spălînd vata sau filtrele cu două porțiuni a cîte 10 ml apă fierbinte.

Modul de lucru

Se adaugă extrasului 10 ml citrat, 2 picături indicator și se alcalinizează cu amoniac pînă la viraj albastru (pH 8—9). Se adaugă 2 ml dimetilglioximă și se aduce într-o pîlnie de separare, unde se extrage cu trei porțiuni a cîte 3 ml cloroform, care se colectează într-o a doua pîlnie de separare. Cloroformul se spală ușor, în pîlnia de separare, cu 5 ml amoniac. Cloroformul spălat se trece într-o a treia pîlnie de separare și se extrage cu 2 porțiuni a cîte 4 ml HCl 0,5 N, care se colectează într-o eprubetă gradată. În această eprubetă se adaugă 3 picături iod 0,1 N, iar după 10 minute se introduce, cu grijă, amoniac pînă la decolorare și încă 0,5 ml în plus. Se adaugă apoi 0,5 ml dimetilglioximă și se completează la 10 ml cu apă.

În paralel cu probele se lucrează și proba martor.

După 10 minute se măsoară extincția probelor, la spectrofotometru, la $\lambda = 465$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 20 μg nichel, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus.

Valorile extincțiilor se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a Ni, în μg în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Ni/m³ aer:

$$\text{mg/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația nichelului, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Pentru a se verifica operația de extracție, se recomandă ca la fiecare serie de probe să se prelucreze și un standard cu 10 μg nichel.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru nichelcarbonil*

Principiu

Nichelcarbonilul, în prezența cloraminei și în mediu acid, se descompune, eliberînd nichelul, care se dozează colorimetric cu dimetilglioximă.

Reactivi

1. Cloramină T, soluție 1,5% în alcool etilic (se conservă maximum 30 zile). 2. Acid clorhidric, soluție 1 : 1. Se diluează un volum de HCl d = 1,19

cu un volum de apă. 3. Dimetilglioximă, soluție 1% în alcool etilic. 4. Hidroxid de sodiu, soluție 20%. 5 și 6. Soluții standard (se prepară ca la dozarea Ni din aer).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 200 litri aer, cu un debit de 1—2 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml cloramină și cîte 0,5 ml HCl 1 : 1, care se adaugă în momentul recoltării.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevede încă două, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul absorbitoarelor se transvazează cantitativ în eprubete gradate, care se completează la 10 ml cu alcool. În fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,6 ml dimetilglioximă și 0,5 ml hidroxid de sodiu 20%.

Paralel cu probele de lucru se prelucrează și o probă martor.

După 30 minute se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 465$, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 2 și 10 μg nichel, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus.

Valorile extincțiilor se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C și Ni, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg nichelcarbonil/m³ aer :

$$\text{mg } Ni(CO)_4/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 2{,}9$$

în care :

C = concentrația Ni, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri ;
2,9 = factorul de transformare a Ni în $Ni(CO)_4$.

Observații

1. În timpul recoltării se recomandă ca absorbitoarele să fie menținute într-un vas cu gheață, pentru a preveni evaporarea lichidului. 2. Dacă în timpul recoltării s-a evaporat mult lichid, soluțiile se transvazează într-o singură eprubetă și se dozează nichelul total. Dacă volumul celor două absorbitoare (luate împreună) depășește volumul de 10 ml, dozarea se execută separat, în fiecare absorbitor, iar rezultatele se însumează.

D. Dozare din urină și sînge

1. *Metoda spectrofotometrică pentru nichel*

Principiu

Principiul metodei este același ca la dozarea Ni din aer.

Reactivi

1—9. (reactivii de la dozarea Ni din aer). 10. Acid azotic d = 1,42 ; 11. Acid percloric 60—70%.

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea probelor

Se recoltează urina, o singură emisiune (spot) sau se colectează urina din 24 ore în recipiente bine spălate. Dacă urina nu poate fi pusă în lucru în primele 10—15 ore, se adaugă cîte 5 ml HNO_3 conc. la fiecare 100 ml urină, ținîndu-se seama de acest adaus la măsurarea probelor. Sîngele se recoltează prin puncție venoasă într-un pahar mic care conține 100 mg fluorură de sodiu.

Pregătirea probelor

Probele — 10 ml sînge sau 100 ml urină — se mineralizează după tehnica descrisă la dozarea manganului în urină și sînge.

În aceleași condiții se prelucrează și o probă de apă distilată (în volum egal cu al produsului biologic) care se tratează cu acid azotic și percloric, la fel cu probele, constituind martorul.

Modul de lucru

Reziduul de la mineralizare se dizolvă în 40 ml HCl 0,1 N, se adaugă 10 ml citrat de amoniu, două picături indicator și se alcalinizează cu amoniac pînă la viraj albastru (pH 8—9).

În continuare, probele se prelucrează după tehnica descrisă la dozarea nichelului din aer.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg nichel la litru de urină (sau urina din 24 ore) și μg nichel la 100 ml sînge:

$$\mu g \text{ nichel/litru urină} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

$$\mu g \text{ nichel/100 ml sînge} = \frac{C}{V} \cdot 100$$

în care:

C = concentrația Ni din proba de urină sau sînge, în μg;

V = volumul de urină sau sînge luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

La persoanele fără expunere la nichel, se găsesc concentrații de pînă la 10 μg Ni/100 ml sînge și 100 μg Ni/litru urină.

II.2.9. CROMUL

A. Izolare

Cromul (compușii de Cr^{3+} și Cr^{6+}), sub formă de pulberi sau aerosoli, sînt reținuți din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Cromul din produse organice necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare. În lichidul de la mineralizare, în funcție de procedeu se găsește Cr^{3+} (mineralizare cu H_2SO_4 și HNO_3 sau calcinare) sau Cr^{6+} (mineralizare cu H_2SO_4, HNO_3 și acid percloric sau calcinare în prezența de KNO_3).

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Acid cromotropic 0,1% în acid sulfuric conc. și acid fosforic :* în prezența Cr^{3+} se formează un complex de culoare roșie.

2. *Oxidanți (apă de brom, perhidrol, PbO_2)* : în mediu alcalin, se observă, în prezența Cr^{3+}, modificarea culorii de la verde, la galben (CrO_4^{2-}).

3. *Difenilcarbazidă 1% în alcool :* în prezența Cr^{6+} apare o colorație violetă intensă. Sensibilitatea : 0,05 μg/ml. Reacția este utilizabilă și pentru Cr^{3+}, dacă este transformat în prealabil în Cr^{6+}, în modul următor : soluția de analizat se tratează cu 2—3 picături de $AgNO_3$ 1% și cîteva cristale de persulfat de potasiu. Se încălzește 15 minute pe baia de apă, apoi se adaugă 5 picături HCl 10% și se încălzește din nou. La răcire se tratează cu difenilcarbazidă.

4. *Acid sulfuric conc., 1—2 picături, 1 ml eter, cîteva picături perhidrol :* se agită, se observă stratul eteric, care în prezența Cr^{6+} este colorat în albastru, prin formarea acidului peroxocromic, extractibil în eter.

5. *Diferențierea CrO_4^{2-} de $Cr_2O_7^{2-}$: CrO_4^{2-}* dă un precipitat galben de $BaCrO_4$ la tratare cu $BaCl_2$ 10%. $Cr_2O_7^{2-}$ dă acest precipitat numai în mediu tamponat cu acetat de sodiu. CrO_4^{2-} dă un precipitat roșu-brun de Ag_2CrO_4 la tratare cu $AgNO_3$ 1%.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Cromul hexavalent formează cu s-difenilcarbazida, în soluție acidă, un compus solubil de culoare roșie-violetă, de compoziție necunoscută. Compusul colorat este, probabil, un complex cu cromul, Cr^{3+} al difenilcarbazonei rezultată prin oxidarea difenilcarbazidei.

Cromul trivalent necesită, pentru a fi determinat, o oxidare prealabilă la Cr^{6+} și eliminarea excesului de oxidant.

Sensibilitatea metodei este de 0,05 μg/ml. Molibdenul hexavalent produce de asemenea o colorație roșie-violetă, însă sensibilitatea reacției este mult mai mică.

Reactivi

1. Acid sulfuric, soluție 0,5 N. 2. Acid azotic d = 1,42. 3. S-difenilcarbazidă 0,1% : se dizolvă 0,1 g difenilcarbazidă în 20 ml acid acetic glacial și se completează la 100 ml cu alcool de 95°. Se prepară proaspăt. 4. Bisulfat de Na sau K. 5. Perhidrol. 6. Permanganat de potasiu, soluție 0,1 N. 7. Carbonat de sodiu, soluție 1 N. 8. Alcool etilic 95°. 9. Azidă de sodiu, soluție 5%. 10. Fosfat monosodic, soluție 4 M. (55,2 g la 100 ml apă). 11. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,2827 g dicromat de potasiu în 1 000 ml acid sulfuric 0,1 N. (1 ml = 0,1 mg crom). 12. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu acid sulfuric 0,1 N în proporție de 1 : 20 (1 ml = 5 μg crom)

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 50 litri aer, cu un debit de 10 litri/minut, printr-un dispozitiv filtrant cu două rondele de hîrtie de filtru suprapuse sau printr-o alonjă cu vată de sticlă.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se preved încă două, care se transportă în teren fără a se aspira aerul prin ele, constituind proba martor.

Modul de lucru

Dacă în zona de muncă se lucrează cu *crom hexavalent* se procedează astfel :

Filtrele sau vata din alonjă se extrag într-un pahar cu 10 ml acid sulfuric 0,5 N fierbinte, peste care se adaugă 1 ml difenilcarbazidă și se amestecă cu o baghetă. Conținutul paharului se filtrează prin vată de sticlă într-un cilindru gradat de 100 ml, spălîndu-se paharul și vata de sticlă cu apă, în porțiuni succesive, pînă la epuizarea culorii. Se aduce volumul lichidului din cilindru la 25 ; 50 ; 75 sau 100 ml, după intensitatea culorii.

În paralel cu probele se prelucrează și probele martor.

Dacă se urmărește și dozarea *cromului trivalent* se procedează astfel :

Filtrele sau vata din alonjă se extrag la cald cu porțiuni succesive de HNO_3 conc. Extractele se reunesc, se adaugă 0,5 g bisulfat de potasiu și se mineralizează. Se continuă mineralizarea adăugînd porțiuni a cîte 5 ml HNO_3 pînă la obținerea unui reziduu alb. Dacă după mai multe evaporări reziduul nu este complet alb, se adaugă 2—5 ml perhidrol și se încălzește pînă la sicitate. Reziduul este reluat cu 10 ml apă fierbinte și filtrat într-un vas conic de 50—100 ml. Pentru a se asigura oxidarea completă a Cr^{3+} în Cr^{6+}, se adaugă 0,1 ml $KMnO_4$ 0,1 N, o picătură Na_2CO_3 1 N și se fierbe moderat 5 minute. Se reduce excesul de $KMnO_4$ prin adaus de alcool etilic sau azidă de sodiu, picătură cu picătură, la cald. După decolorare și răcire se filtrează prin vată de sticlă într-un balon cotat de 25 ml, spălînd cu cîteva porțiuni de H_2SO_4 0,5 N. Se adaugă 1 ml difenilcarbazidă și, după 1 minut, 2,5 ml fosfat monosodic, se amestecă și se aduce la semn cu H_2SO_4 0,5 N.

În paralel cu probele se prelucrează și martorul.

După 30 minute se măsoară extincția probelor la un spectrofotometru la $\lambda = 540$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 25 μg crom, prin puncte de 5 în 5, în condițiile descrise mai sus.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C de crom, în μg, în probă. Dacă volumul probelor este de 50, 75 sau 100 ml, rezultatul se înmulțește cu 22,3 sau 4.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Cr/m³ aer sau mg CrO_3/m³ aer :

$$\text{mg Cr/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \text{ sau mg } CrO_3/\text{m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1{,}923$$

în care :

C = concentrația cromului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri ;
1,923 = factorul de transformare a Cr în CrO_3.

Observație

Dacă se determină și Cr^{3+} se face și un standard de crom trivalent, iar curba se lucrează începînd de la oxidare, întocmai ca și probele.

D. **Dozare din urină și sînge**

1. *Meloda spectrofotometrică*

Principiu

Principiul metodei este același ca la dozarea Cr din aer.

Reactivi

Reactivii 1—5 și 10—12 de la dozarea Cr din aer.

Recoltarea probelor

Se recoltează probele de urină și sînge ca la dozarea Ni.

Pregătirea probelor

Urină: la 100 ml urină se adaugă 20 ml acid azotic d = 1,42 și 1—2 g bisulfit de potasiu crist. se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește pe baia de nisip pînă ce rămîn 2—3 ml. După răcire se adaugă încă 5 ml acid azotic conc. și se repetă adăugarea de HNO_3 și răcirea pînă la decolorarea reziduului. Dacă reziduul nu este complet alb, se adaugă 2—5 ml perhidrol și se repetă încălzirea.

Sînge: la 10 ml sînge omogenizat cu o baghetă se adaugă 10 ml acid azotic conc., 1—2 g bisulfit de potasiu crist., se acoperă cu o sticlă de ceas și se continuă ca la urină, adăugînd cîte 10 ml HNO_3 conc. pînă la reziduu complet alb. Dacă reziduul nu este alb, se adaugă 2—5 ml perhidrol și se repetă încălzirea.

În paralel cu probele de urină și sînge se prelucrează cîte o probă de 10 sau 100 ml apă distilată, în care se adaugă reactivii în condițiile probelor, care vor constitui martorii.

Modul de lucru

Reziduul de la mineralizare se dizolvă în 10 ml acid sulfuric 0,5 N și se filtrează într-un balon cotat de 25 ml. Se spală paharul și filtrul cu încă 10 ml acid sulfuric 0,1 N și se aduc tot în balonul cotat. Se adaugă 1 ml difenilcarbazidă și, după 1 minut, 2,5 ml fosfat monosodic. Se aduce la semn cu acid sulfuric 0,5 N.

În paralel cu probele se prelucrează martorul.

După 10 minute se citește extincția probelor la spectrofotometru la λ = 540 nm în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 25 μg crom, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus.

Valoarea extincțiilor pentru probe se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a Cr în probă, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg crom/litru urină sau 100 ml sînge:

$$\mu g \text{ crom/litru urină} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

$$\mu g \text{ crom/100 ml sînge} = \frac{C}{V} \cdot 100$$

în care:

C = concentrația Cr în urină sau sînge, în μg;
V = volumul de urină sau sînge luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

La persoanele neexpuse la crom, eliminarea urinară este de aproximativ 10 μg/litru ; în expunerile profesionale, se întîlnesc valori de 15—300 μg/litru urină.

II.2.10. MANGANUL

A. **Izolare**

Manganul și compușii săi, sub formă de aerosoli și pulberi, sînt reținuți din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Manganul din produse organice necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică, prin mineralizare sulfonitrică sau sulfonitrică perclorică.

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu un oxidant, — care oxidează Mn^{2+} la Mn^{7+} (culoare violetă) — și anume :

1. *Dioxid de plumb + HNO_3 conc. :* la fierbere dezvoltă culoarea violetă. Reacția este pozitivă numai în absența Cl^-, care reduce MnO_4^-. Ionul clor se îndepărtează prin precipitare cu $AgNO_3$.

2. *Apa de brom în mediu puternic alcalin și cîteva picături de $CuSO_4$* 10% (catalizator) : se obține culoare violetă.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Manganul (Mn^{2+} și Mn^{4+}) în mediu acid și în prezența azotatului de argint (catalizator) se oxidează la Mn^{7+} (ion permanganat) de culoare violetă, cu persulfat de potasiu :

$$2\,MnSO_4 + 5\,K_2S_2O_8 + 8\,H_2O = 2\,HMnO_4 + 5\,K_2SO_4 + 7\,H_2SO_4$$

Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg/ml. Cromul, vanadiul, ceriul, interferă cînd sînt în concentrații mari.

Reactivi

1. Acid sulfuric 20% (v/v) din H_2SO_4 conc. d = 1,84. 2. Persulfat de potasiu, soluție saturată. Se prepară extemporaneu ; 3. Azotat de argint, soluție 5% ; 4. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,2876 g $KMnO_4$ în 80 ml apă, se acidulează cu 3—4 ml H_2SO_4 20%, se adaugă 0,5 g bisulfit de sodiu și se fierbe pentru eliminarea excesului de SO_2. După răcire se completează cu apă la 100 ml (1 ml = 1 mg Mn); 5. Soluția standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg Mn).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 50 litru aer, cu un debit de 1,5—2 litri/minut printr-un absorbitor care conține 10 ml acid sulfuric 20% sau cu un debit de 10 litri/minut printr-o alonjă cu vată de sticlă umectată cu 1—2 ml acid sulfuric 20%.

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se prevede încă unul, se transportă în teren, fără a aspira aer prin el, costituind martorul.

Scanned with OKEN Scanner

Pregătirea probelor

Se aduce conținutul absorbitorului într-un pahar de 100 ml. Se spală absorbitorul cu cîte 5 ml H_2SO_4 20%, de două ori, aducînd lichidele tot în pahar. În cazul recoltării prin alonjă, se extrage vata cu cîte 10 ml H_2SO_4 20%, de două ori și cu 10 ml apă fierbinte, de două ori, reunind lichidele de spălare într-un pahar de 100 ml.

Modul de lucru

Paharele cu soluțiile probelor se încălzesc pe baia de nisip pînă la apariția vaporilor albi de SO_2. Se trece, după răcire, lichidul într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml prin spălarea paharului. Se iau 5 ml din această soluție (1/2 din probă) se adaugă 0,1 ml $AgNO_3$, 2,5 ml persulfat de NH_4 și 2 ml H_2SO_4 20%. Se țin eprubetele timp de 5 minute într-o baie de apă la 80°C ca să se dezvolte culoarea, apoi se completează la 10 ml cu apă.

În paralel cu probele se prelucrează și martorul.

Extincțiile probelor se măsoară la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg mangan, prin puncte de 10 în 10, în condițiile de mai sus.

Valorile extincțiilor se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C în μg mangan.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Mn/m³ aer :

$$\text{mg Mn/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 2$$

în care :

C = concentrația manganului în 1/2 din probă, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

D. **Dozare din urină și sînge**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

1—5 (reactivii de la dozarea Mn din aer) ; 6. Acid azotic d = 1,42 ; 7. Acid percloric 60—70%.

Recoltarea probelor

Se recoltează probele de urină și sînge ca la dozarea Ni.

Pregătirea probelor

Urină : la minimum 200 ml urină se adaugă 20 ml HNO_3 d = 1,42 se acoperă cu sticlă de ceas și se încălzește pe baia de nisip pînă ce volumul este de 2—3 ml. După răcire, se adaugă 5 ml apă distilată și încă 10 ml HNO_3 și se încălzește, pînă cînd nu se mai emit vapori bruni, iar lichidul este limpede. Dacă înainte de aceasta lichidul s-a evaporat, se repetă adăugarea de apă și HNO_3 și se încălzește din nou, cu grijă să nu se carbonizeze. La lichidul final (cîțiva ml) se adaugă, după răcire, 1 ml acid percloric și 2—3 ml apă. Se continuă încălzirea, cu paharul acoperit, pînă la decolorare completă. Pentru îndepărtarea urmelor de acid percloric, se adaugă de cîteva ori, 5 ml

Scanned with OKEN Scanner

apă și se evaporă. Reziduul trebuie să fie alb, cristalin.

Sînge: la 15—20 ml sînge (bine omogenizat) se adaugă 10 ml HNO_3 d = 1,42 se acoperă cu sticlă de ceas și se continuă ca la urină.

În paralel cu probele de analizat se prelucrează probele martor, cu o cantitate de apă egală cu cea de urină, respectiv sînge, și tratate la fel cu probele.

Modul de lucru

Reziduul de la mineralizare este tratat cu 10 ml acid sulfuric 20% și încălzit pe baia de nisip pînă la apariția vaporilor albi de SO_2. După răcire se filtrează, prin frită sau vată de sticlă, în eprubete gradate, spălînd filtrul cu 5 ml apă distilată. Se adaugă 2,5 ml persulfat de potasiu și 0,1 ml azotat de argint, se menține 5 minute pe baia de apă la 80°C. După răcire se completează la 10 ml cu acid sulfuric 20%.

În paralel cu probele de analizat se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincțiile probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg mangan, prin puncte din 10 în 10, în condițiile de mai sus.

Valorile de extincție se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C în μg mangan în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg mangan la litru de urină (sau la urina din 24 ore) și μg mangan la 100 ml sînge:

$$\mu g \text{ mangan/litru urină} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

$$\mu g \text{ mangan/100 ml sînge} = \frac{C}{V} \cdot 100$$

în care:

C = concentrația Mn din proba de urină sau sînge, în μg;
V = volumul de urină sau sînge luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

Manganuria normală este de 5—10 μg/litru, iar manganemia normală, de 8—25 μg/100 ml sînge.

II.2.11. ZINCUL

A. Izolare

Zincul sub formă de aerosoli (ZnO) este reținut din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Zincul din produse organice necesită, în prealabil, eliberarea din substanța organică prin mineralizare cu clor sau acizi.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Ferocianură de potasiu 10%* : apare un precipitat alb de ferocianură de Zn, solubil în alcalii.

2. *Reactiv Montequi A* (5 g sulfat de cupru se dizolvă în 100 ml apă și se adaugă 0,2 ml H_2SO_4 conc.), 1 picătură și, după agitare, *reactiv Montequi B* (8 g $HgCl_2$ și 9 g NH_4SCN în 100 ml apă) 2 ml ; se formează un precipitat de terasulfocianatomercuriat de Cu și Zn, $CuZn[Hg(SCN)_4]_2$, violet.

3. *Acid rubeanic* (soluție 1% în alcool) : apare, în prezența acetatului de sodiu, o colorație (precipitat) galben-deschis, de rubeanat de zinc.

4. *8-hidroxichinolină* (soluție 1,5% în acid acetic) : se formează un precipitat galben-verzui de oxinat de zinc.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Zincul formează cu ditizona, la pH 5,5—6, un complex colorat (ditizonat de zinc).

Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg/ml. Ditizona dă complecși colorați și cu alte metale, însă în condițiile metodei specificitatea este asigurată prin adaus de complexanți, care leagă metalele interferente, și prin pH la care se face extracția.

Reactivi

1. Acid azotic 10%. 2. Hidroxid de sodiu 10%. 3. Hidroxid de amoniu 2 N. 4. Roșu de metil, soluție 0,02% în etanol. 5. Cloroform distilat. 6. Ditizonă (v. dozarea Pb) diluată cu cloroform 1 : 10. 7. Soluție de spălare : se dizolvă 5 g tiosulfat de sodiu și 20 g acetat de sodiu crist. într-o soluție formată din 10 ml acid acetic conc. și 500 ml apă distilată. 8. Soluție tampon : se amestecă 10 ml amoniac 2 N, 3 ml oxalat de amoniu 5%, 30 ml KCN 5%, 90 ml acetat de sodiu 10%, 240 ml tiosulfat de Na 50%, 150 ml acetat de sodiu 10%, 70 ml HCl 1 N și se completează cu apă bidistilată la 1 000 ml. Se purifică cu ditizonă. 9. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,4398 g $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ în 1 000 ml apă bidistilată 1 ml = 0,1 mg Zn ; 10. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 1 μg Zn).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 25 litri aer, cu o viteză de 1 litru/minut printr-un absorbitor care conține 10 ml HNO_3 10%, timp de 20—25 minute, sau printr-un dispozitiv filtrant format din două rondele de hîrtie de filtru, suprapuse.

În afară de dispozitivele destinate probelor, se prevăd încă două, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind martorul.

Modul de lucru

Probele recoltate (filtrele se introduc în 10 ml HNO_3) se introduc într-o pîlnie de separare, se spală absorbitoarele cu apă bidistilată, repetat, întrebuințînd în total 50 ml apă. Se adaugă 2—3 picături de roșu de metil pentru asigurarea unui pH = 5,5—6,0 și NaOH 10% pînă la virajul indicatorului la galben deschis. Se adaugă 10 ml soluție tampon, 2 ml ditizonă diluată 1 : 10 cu cloroform pentru proba martor și 5 ml pentru probele de analizat.

(în cazul probei martor se vor mai adăuga 3 ml cloroform). După separarea fazelor, se transvazează faza ditizonică în altă pîlnie de separare, iar la soluția rămasă în prima pîlnie se mai adaugă 1—5 ml ditizonă, în mai multe porțiuni, pînă cînd stratul ditizonic rămîne verde. Extractele ditizonice reunite sînt spălate de 2 ori cu cîte 5 ml soluție de spălare, odată cu 10 ml apă bidistilată și de 3 ori cu cîte 10 ml NH_4OH 2 N, pînă cînd faza apoasă își pierde culoarea galbenă. Extractul ditizonic este trecut într-o eprubetă și completat la 20 ml cu cloroform.

În paralel se prelucrează probele martor la fel cu probele de analizat.

Se diluează proba 1 : 1 cu cloroform și se citește extincția, la spectrofotometru, la $\lambda = 540$, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 5 μg Zn, prin puncte din 1 în 1, în condițiile descrise mai sus.

Valorile de extincție se raportează la curba de etalonare, obținîndu-se concentrația C a Zn, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg Zn/m³ aer :

$$\text{mg Zn/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația zincului, în probă, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

II.2.12. BARIUL

A. Izolare

Bariul din produse organice se eliberează din substanța organică prin mineralizare sulfonitrică sau cu clor, sau prin calcinare.

B. Identificare

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Dicromat de potasiu :* apare un precipitat galben de $BaCrO_4$ insolubil în acid acetic.

2. *Iodat de potasiu :* se formează un precipitat de $Ba(IO_3)_2$, care la microscop prezintă forme caracteristice.

3. *Rodizonat de sodiu :* apare un precipitat roșu-brun de rodizonat de bariu, insolubil în acizi minerali diluați.

II.2.13. TALIUL

A. Izolare

Taliul din produsele organice se eliberează prin mineralizare cu clor sau prin metoda sulfonitrică cu adaus de perhidrol (temperatura de încălzire nu va depăși 350°C). Lichidul de la mineralizare se alcalinizează și se tratează cu SO_2 pentru reducerea Tl^{3+} la Tl^{+}.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

Soluția de analizat se tratează cu :

1. *Acid clorhidric 10% :* apare un precipitat alb de TlCl.
2. *Cromat de potasiu 10% :* apare un precipitat galben de Tl_2CrO_4 insolubil în acid azotic la rece, spre deosebire de $BaCrO_4$, $PbCrO_4$.
3. *Iodură de potasiu 5%* : apare un precipitat galben-portocaliu de TlI, foarte puțin solubil în apă.

II.3. DETERMINAREA UNOR ACIZI, BAZE ȘI SĂRURI

Acizii, bazele, sărurile se pot izola din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate : apă distilată, baze diluate sau acizi diluați.

Din produse biologice (conținut stomacal, vomismente, sînge, viscere, corpuri delicte, resturi alimentare și vestimentare etc.) izolarea se realizează prin :

— simplă macerare cu apă : se adaugă apă la produsul de analizat pînă la obținerea unei mase semifluide, care se filtrează (dacă este necesar, se folosește filtrarea în vid) ;

— dializă și electrodializă (v. Izolarea toxicilor minerali) ;

— extracție cu alcool (în cazul nitraților și nitriților) : se alcalinizează produsul de analizat cu Na_2CO_3, se tratează cu KCl, apoi se deproteinizează cu acetat de plumb și se filtrează. Excesul de plumb din filtrat este îndepărtat prin tratare cu Na_2CO_3. Filtratul este concentrat pe baia de apă. Dacă este colorat, se alcalinizează ușor și se tratează cu cărbune animal, se filtrează și se concentrează pe baia de apă la volum mic ;

— extracție cu eter în mediu acid (în cazul acidului oxalic) (v. Izolarea toxicilor organici nevolatili) ;

— calcinare (în cazul fluorurilor, bromurilor) (v. Izolarea toxicilor minerali).

Identificarea acizilor și bazelor este posibilă numai dacă analiza se execută rapid, înainte ca acizii să treacă în săruri și hidroxizii în carbonați.

II.3.1. ACIZI

Probe preliminare : se aplică, pe produsul solid sau în lichidul de analizat, hîrtii indicatoare de pH : indicator universal, turnesol, roșu de Congo, metilorange, violet de metil, dimetilaminoazobenzen etc.

Acidul azotic

Identificare

— Reacția xantoproteică : cu substanțele proteice (de exemplu, pielea), se obține o colorație galbenă.

— Soluția de analizat se tratează cu cîteva picături de difenilamină 1% în acid sulfuric concentrat, cînd apare o culoare albastră, datorită formării albastrului de difenilbenzidină. Reacția este pozitivă pentru toți oxidanții.

— Peste soluția de analizat se adaugă cîteva cristale de brucină și 1 ml acid sulfuric concentrat, cînd apare o colorație roșie-vișinie, care trece în portocaliu, apoi în galben.

— Reacția cu sulfat feros se execută ca la azotați.

Acidul clorhidric

Identificare

— Soluția de analizat, acidulată cu HNO_3, formează, la tratare cu $AgNO_3$ 1%, un precipitat alb de AgCl, insolubil în acid azotic, solubil în amoniac.

— Soluția de analizat oxidată cu $KMnO_4$ în prezența acidului sulfuric, eliberează ionul clor. Acesta deplasează iodul din iodura de potasiu (evidențiat prin înălbăstrirea soluției de amidon) sau sulfocianul din sulfocianura de mercur (evidențiat prin formarea sulfocianurii ferice, de culoare roșie, cu săruri ferice).

Acidul sulfuric

Identificare

— La soluția de analizat se adaugă cîțiva mililitri de acetat de plumb 10%, cînd se formează un precipitat alb de sulfat de plumb, insolubil în acid acetic.

— Soluția de analizat se tratează cu 1—2 ml clorură de bariu 10%, cînd apare un precipitat alb de sulfat de bariu, insolubil în acid clorhidric. Reacția se pretează la dozarea turbidimetrică a acidului sulfuric (ca stabilizator al suspensiei se utilizează glicerina).

Acidul acetic

Identificare

— La soluția de analizat se adaugă cîteva picături de etanol, 1 ml H_2SO_4 conc. și se încălzește la fierbere, cînd se formează acetatul de etil, decelabil prin mirosul caracteristic de fructe.

— Soluția de analizat, neutralizată cu NaOH 10% și tratată cu cîteva picături de clorură ferică 5%, se colorează în roșu, prin formarea acetatului de hexaacetatodioltriferic.

— La soluția de analizat, alcalinizată cu NaOH 0,1 N, se adaugă cîțiva mililitri azotat de lantan, soluție apoasă 5%. Se omogenizează, se încălzește la fierbere și se adaugă 0,5 ml iod 0,01 N. După 10 minute se observă o colorație albastră-verde, datorită adsorbției iodului de către acetatul bazic de lantan. Reacția se pretează și pentru dozarea acidului acetic.

Acidul oxalic

Identificare

— Soluția de analizat, acidulată cu H_2SO_4 10% și tratată cu 1—2 picături de permanganat 1%, la cald, se decolorează.

— La soluția de analizat se adaugă puțină pulbere de rezorcină, se agită și se introduc, în fundul eprubetei, cu grijă, 2 ml H_2SO_4 conc., cînd apare, la limita de separație a lichidelor, un inel albastru.

— Se alcalinizează soluția de analizat cu amoniac și se tratează cu $CaSO_4$ soluție saturată, cînd se obține un precipitat de oxalat de calciu, insolubil în acid acetic, solubil în acid clorhidric. La acidulare slabă cu acid

Scanned with OKEN Scanner

acetic, oxalatul de calciu trece în formă cristalină, ușor de recunoscut la microscop prin forma cristalelor, în „plic de scrisoare".

— Soluția de analizat este tratată cu o granulă de zinc și 1 ml HCl conc. Se fierbe un minut, se răcește și se adaugă 5 picături de fenilhidrazină clorhidrică 1% (proaspăt preparată). Se fierbe, se răcește, se adaugă un volum egal de HCl conc. și cîteva picături de fericianură de potasiu 5%, cînd apare o coloratie roșie, datorită unui compus chinoniminic dat de acidul glioxilic, HOOC—CHO, rezultat din reducerea acidului oxalic (reacția Paget).

II.3.2. BAZE

Probe preliminare: se aplică pe produsul solid sau în lichidul de analizat, hîrtii indicatoare de pH.

Identificarea carbonaților: se tratează soluția de analizat cu acizi tari, cînd, în prezența carbonaților și a carbonaților acizi de Na și K, se degajă CO_2, care, prin barbotare într-o soluție de $Ba(OH)_2$, formează $BaCO_3$, precipitat alb.

Diferențierea carbonatului de Na de carbonatul acid de Na: soluția de carbonat are pH > 10, iar carbonatul acid are pH 8—8,5.

Diferențierea hidroxizilor de carbonați: soluția de analizat, tratată cu o picătură de fenolftaleină, se înroșește, atît în prezența hidroxizilor, cît și a carbonaților. La adăugare de 3—4 picături de $BaCl_2$ 10%, se formează, în prezența hidroxizilor și a carbonaților, un precipitat alb de $BaCO_3$, iar soluția rămîne colorată în roșu, datorită ionului hidroxil. Dacă sînt prezenți numai carbonații, se formează un precipitat de $BaCO_3$, iar soluția se decolorează, datorită lipsei OH^-. Dacă sînt prezenți numai hidroxizii, nu se formează precipitat, iar soluția rămîne roșie.

Hidroxidul de amoniu

Identificare

— Pe o placă de porțelan se depun 2 picături soluție de analizat și o picătură de reactiv p. nitroanilină diazotată, cînd se dezvoltă o coloratie roșie, datorită formării sării de amoniu a p. nitrofenilnitrozaminei.

— La soluția de analizat se adaugă cîteva picături de reactiv Nessler, cînd apare un precipitat roșu-brun.

— Soluția de analizat se încălzește ușor cu cîțiva mililitri de hidroxid de sodiu 30%, ținîndu-se la gura eprubetei o hîrtie de filtru îmbibată cu soluție de azotat mercuros: pe hîrtie apare o pată neagră, datorită formării mercurului metalic.

II.3.3. SĂRURI

Azotiții

Identificare

— La soluția de analizat se adaugă 1 ml amestec de volume egale de reactiv Griesz I și Griesz II (v. Oxizii de azot), cînd apare o coloratie roz. Cuplarea se poate realiza, în loc de naftilamină (componentă a reacti-

vului Griesz), cu N-naftiletilendiamină (NED) (v. Oxizii de azot), cînd apare o coloraţie roşie-violetă.

— La soluţia de analizat se adaugă 2 ml antipirină 1% şi se acidulează cu acid sulfuric 10%, cînd se formează nitrozoantipirina, de culoare verde (v. Fenazona-antipirina). Dacă se adaugă o picătură de fericianură de potasiu 10%, culoarea verde virează la roşu.

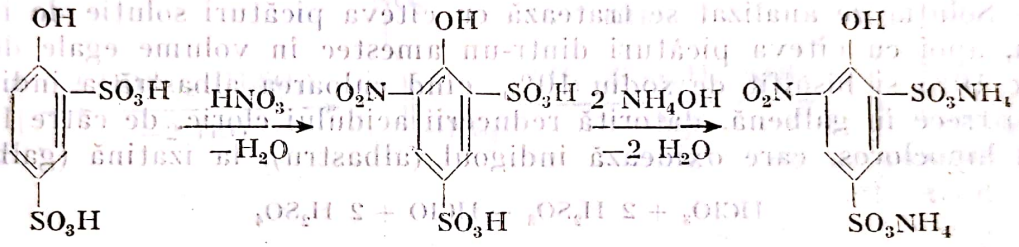
— Se tratează soluţia de analizat cu 1 ml iodură de potasiu 10% şi 1 ml acid sulfuric 10%, cînd se eliberează iod, de culoare roşie-brună, extractibil în cloroform (v. şi Iodul).

Azotaţii

Identificare

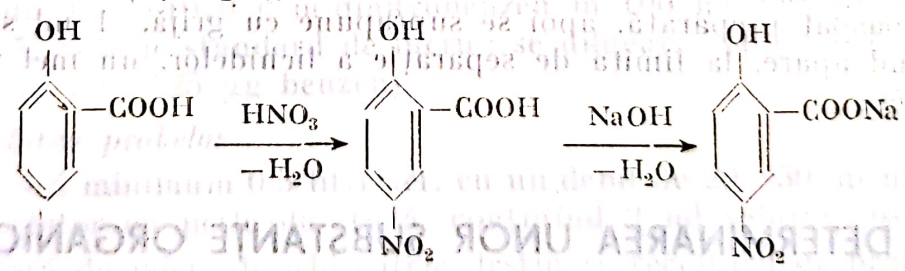
— La soluţia de analizat se adaugă 2 ml antipirină 1% şi 2 ml acid sulfuric conc., cînd apare o coloraţie roşie, datorită formării nitroantipirinei.

— Se evaporă la sec 2 ml soluţie de analizat şi se adaugă peste reziduu, 1 ml reactiv fenoldisulfonic (12 g fenol dizolvat în 144 g acid sulfuric conc.). Se lasă la temperatura laboratorului 15 minute, apoi se diluează cu apă şi se alcalinizează cu amoniac, cînd apare o coloraţie galbenă, datorită formării nitrofenolsulfonatului de amoniu (reacţia Grandwall-Lajour):



— Peste o soluţie saturată de sulfat feros se adaugă 2 ml soluţie de analizat, apoi, cu grijă, 2 ml acid sulfuric concentrat, cînd la zona de contact a lichidelor apare un inel brun, datorită unei combinaţii de adiţie de tipul $(FeSO_4)_x(NO)_y$.

— Se evaporă la sec 2 ml soluţie de analizat alcalinizată cu Na_2CO_3 10% şi peste reziduu se adaugă cîteva cristale de acid salicilic şi cîteva picături de H_2SO_4 conc. Se încălzeşte pe baia de apă, se alcalinizează cu NaOH 30%, cînd apare o coloraţie galbenă, datorită formării nitrosalicilatului de sodiu:



— reacţia cu brucină şi

— reacţia cu difenilamină se execută ca la acidul azotic.

Fluorurile

Identificare

— Soluţia de analizat se adaugă peste o soluţie de sulfocianură de potasiu 1%, care se decolorează, datorită formării complexului $Na_3(FeF_6)$.

— Soluţia de analizat adăugată peste lacul de thoriu (sau zirconiu) cu alizarin-sulfonat de sodiu îi modifică culoarea de la roşu la galben.

Lacul se obține prin amestecarea a 1 ml $CaCl_2$, soluție saturată, cu 1 ml amestec de volume egale de alizarin-sulfonat de sodiu 1% cu nitrat de thoriu (sau zirconiu) 0,02%, apoi acidulare cu HCl 2 N.

Bromurile

Identificare

— Soluția de analizat se tratează cu $AgNO_3$ 10%, cînd se obține un precipitat galben de AgBr, insolubil în acid azotic, solubil în amoniac, cianuri alcaline și tiosulfat de sodiu.

— La soluția de analizat se adaugă cîteva picături de HCl 10%, 1 ml cloroform și 1 ml cloramină 2% (sau alți oxidanți), cînd, la agitare, se eliberează brom, roșu-brun, extractibil în cloroform.

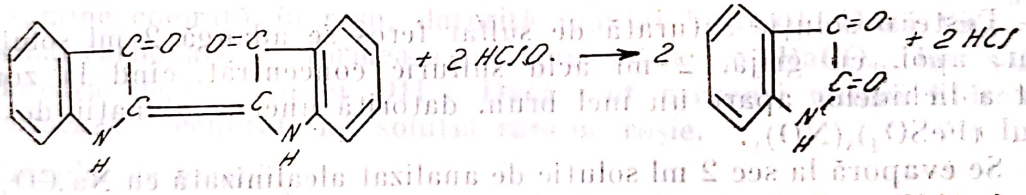
— Pe o hîrtie de filtru se pipetează cîteva picături soluție de analizat, 2 picături HCl 10%, 2 picături cloramină 2%, 2 picături soluție alcoolică de fluoresceină 1%, cînd se dezvoltă o coloraţie roz-roșie, datorită transformării fluoresceinei (galben-verzuie) în eozină (roșie).

Cloraţii

Identificare

— Soluția de analizat se tratează cu cîteva picături soluție de indigocarmin, apoi cu cîteva picături dintr-un amestec în volume egale de acid sulfuric 10% și bisulfit de sodiu 10%, cînd culoarea albastră a indigocarminului trece în galbenă, datorită reducerii acidului cloric, de către H_2SO_3, la acid hipocloros, care oxidează indigoul (albastru), la izatină (galbenă):

$$HClO_3 + 2\ H_2SO_3 \rightarrow HClO + 2\ H_2SO_4$$



— Soluția de analizat se tratează cu cîteva picături de anilină și cîteva picături de HCl conc., cînd apare o culoare violetă, care trece în albastru.

— La 1 ml acid sulfuric concentrat se adaugă 4—5 picături de rezorcină 1% proaspăt preparată, apoi se suprapune cu grijă, 1 ml soluție de analizat, cînd apare, la limita de separaţie a lichidelor, un inel verde (reacţia Dénigès).

II.4. DETERMINAREA UNOR SUBSTANȚE ORGANICE VOLATILE

II.4.1. HIDROCARBURILE AROMATICE

A. Izolare

Hidrocarburile aromatice se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice, prin distilare, antrenare cu vapori de apă sau cu aer.

B. **Identificare**

1. *Reacția Pearce-Janowski :* se extrag hidrocarburile aromatice din distilat cu eter etilic, se usucă stratul eteric pe Na_2SO_4 anhidru și se evaporă la sicitate. Reziduul se nitrează cu amestec sulfonitric, se diluează cu apă și, după răcire, se extrag derivații dinitro formați cu eter. Se evaporă stratul eteric și se reia reziduul cu acetonă. Se tratează soluția acetonică cu soluție 10% de hidroxid de potasiu, în etanol, cînd se formează o colorație roșie-violetă, care virează la galben-portocaliu.

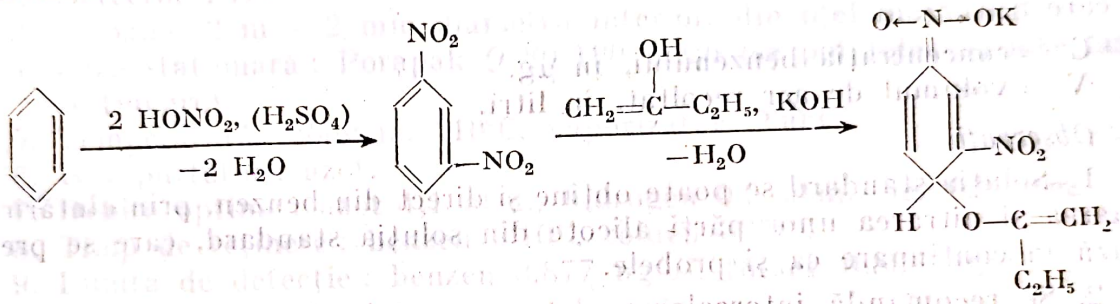
2. *Reacția cu clorură ferică pentru metaboliții fenolici din urină* (v. Fenolul).

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru benzen*

Principiu

Benzenul se nitrează la m-dinitrobenzen care cu metiletilcetona (forma enolică) în mediu alcalin formează un compus de condensare roșu-violet, colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg/ml. Metoda nu este specifică, reacția fiind dată de omologii benzenului și de compușii lui.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : amestec nitrant (1 vol. H_2SO_4 d = 1,84 și 1 vol. HNO_3 d = 1,50) ; 2. Hidroxid de sodiu 40% ; 3. Metiletilcetonă, p.a. ; 4. Hidroxid de potasiu, 30% ; 5. Acid acetic 20% ; 6. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,1076 g m-dinitrobenzen în 100 ml apă (1 ml = 0,5 mg benzen) ; 7. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă, 1:20 (1 ml = 25 μg benzen).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 0,5 litri/aer, cu un debit de 20—50 ml/min. printr-un microabsorbitor cu perle de sticlă, conținînd 2 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

După 30 minute de la recoltare se transvazează conținutul fiecărui microabsorbitor într-o pîlnie de separare. Se spală microabsorbitoarele de 2—3 ori cu cîte 1 ml apă. Se neutralizează proba direct în pîlnie cu NaOH 40% (indicator hîrtie de turnesol), răcindu-se la robinet ; soluția trebuie să rămînă însă la aproximativ 30—35°C. După neutralizare se mai adaugă încă

o picătură NaOH 40%. Se extrage m. dinitrobenzenul prin agitare 3—5 minute, cu 10 ml metiletilcetonă. Se separă faza de solvent într-o eprubetă și se completează cu metiletilcetonă la 10 ml. Se adaugă în eprubetă, agitînd 1,5 ml KOH 30%. Se lasă amestecul la întuneric 10—30 minute, pentru dezvoltarea completă a culorii.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 570$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 20 μg benzen, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a benzenului în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg benzen/m³ aer :

$$\text{mg benzen/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația benzenului, în μg.

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Soluția standard se poate obține și direct din benzen, prin cîntărirea, diluarea și nitrarea unor părți alicote din soluția standard, care se prelucrează în continuare ca și probele.

2. Se recomandă intercalarea, între aparatele de măsură, pompe și microabsorbitor, a unui dispozitiv de reținere a vaporilor acizi, în scopul protejării aparaturii.

3. Dacă după introducerea soluției de KOH, soluția cetonică se tulbură (se formează K_2SO_4 din KOH și urmele de H_2SO_4) se adaugă 0,2 ml acid acetic 20% și se fotometrează imediat față de martor.

2. *Metoda gazcromatografică pentru benzen și toluen*

Principiu

Se aspiră un volum cunoscut de aer într-un tub umplut cu cărbune pentru adsorbția vaporilor prezenți. Cărbunele din tub este trecut într-o eprubetă gradată prevăzută cu dop etanș pentru desorbție cu sulfură de carbon. Un alicot din proba resorbită este injectat în gazcromatograf. Aria picului rezultat este determinată și comparată cu ariile obținute prin injectarea standardelor.

Sensibilitatea metodei este de ordinul nanogramelor/μl. Metoda este specifică, realizîndu-se separarea de alți toxici industriali cu care se află în amestec hidrocarburile aromatice. Umiditatea ridicată scade adsorbția vaporilor organici de către cărbune.

Reactivi

1. Benzen CHR ; 2. Toluen CHR ; 3. Sulfură de carbon CHR ; 4. Cărbune activ 200/400 mesh.

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea probelor

Se aspiră un volum cunoscut de aer printr-un tub de oțel inoxidabil cu diametrul interior de 3 mm și lungimea de 8 cm, umplut cu cărbune activ (activat de la 300°C) și astupat la ambele capete cu dopuri de vată de sticlă silanizată. Aspirarea aerului se realizează cu ajutorul unei pompe de aspirație al cărui debit poate fi determinat cu exactitate sau a unei seringi de capacitate mare.

Modul de lucru

După recoltarea a 1—5 litri aer, cărbunele activ din tub se trece într-o microeprubetă gradată cu dop etanș, în care se găsesc 2 ml CS_2. Desorbția este completă în 30 minute, dacă se agită proba din cînd în cînd în acest interval. Se completează volumul inițial cu CS_2 (o parte din CS_2 s-a evaporat). Toate operațiile se execută sub nișă. Un volum de 1 µl—5 µl de solvent de extracție se introduce în gazcromatograf cu ajutorul unei seringi Hamilton de 10 µl.

Condiții gazcromatografice

1. Aparat Carlo Erba, model Fractowap 2400 T.
2. Detector FID.
3. Coloană, 2 m × 2 mm diametru interior, din oțel inoxidabil.
4. Fază staționară: Porapak Q 80/120 mesh (se pot folosi și alte faze staționare).
5. Temperatură: coloană, 210°C, vaporizator, 230°C.
6. Gaz purtător: azot.
7. Debite optime: azot 1,1 atm., hidrogen 0,5 atm., aer 0,9 atm.
8. Timp de reținere: benzen 2′10″, toluen 3′20″.
9. Limita de detecție: benzen 0,877 ng/µl, toluen 0,866 ng/µl.

Calcul și exprimare

Determinarea cantitativă se realizează prin calibrare directă, injectînd în gazcromatograf volume de 1—5 µl din etaloane de 1—1 000 ppm. Răspunsul este liniar în acest domeniu.

Rezultatele se exprimă în mg/m³. Concentrația din probă se calculează prin metoda celor mai mici pătrate, conform ecuației: $y = a + b \cdot x$ unde y = înălțimea piculuí (în mm) sau aria din curba de etalonare, x = concentrația în benzen sau toluen din proba necunoscută, a și b = parametri calculabili.

Este indicat ca soluțiile standard să fie analizate concomitent cu probele, pentru a reduce la minimum posibilitatea de eroare.

3. Metoda colorimetrică liniară pentru benzen și toluen

Principiu

Benzenul colorează în cenușiu-negru, iar toluenul în brun-închis, pulberea de silicagel impregnată cu KIO_3 în H_2SO_4.

Reactivi

1. Iodat de potasiu (1 g la 90 ml H_2SO_4 conc.). 2. Pulbere de silicagel (cu diametrul granulelor de 0,16—0,25 mm pentru benzen și de 0,25—0,32 mm pentru toluen) se fierbe de cîteva ori cu apă, se esorează și se

Scanned with OKEN Scanner

usucă la 85°C. 3. Pulbere indicatoare : se tratează 10 g silicagel cu 6 ml KIO_3, se omogenizează, se usucă o oră la 175—185°C, apoi se răcește în exsicator pe H_2SO_4. 4. Tuburi indicatoare (v. Oxidul de carbon).

Modul de lucru

Se aspiră aer prin tub cu ajutorul analizorului de gaze universal UG-1. După 2 minute de la recoltare, se măsoară lungimea stratului colorat pe scara aparatului gradată în mg benzen/l aer, respectiv mg toluen/l aer, corespunzînd concentrațiilor de 0—2 mg benzen/l, la aspirarea a 175 ml aer, respectiv de 0—2 mg toluen/l, la aspirarea a 250 ml aer.

4. *Metoda spectrofotometrică pentru stiren*

Principiu

Stirenul, $C_6H_5—CH = CH_2$, reacționează cu acidul sulfuric concentrat, dînd sulfat acid de feniletil, galben, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de aproximativ 10 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece toți omologii benzenului cu catenă nesaturată dau această reacție.

Reactivi

1. Soluție absorbantă: acid sulfuric concentrat, d = 1,84 ; 2. Soluție standard stoc : se dizolvă aproximativ 0,25 ml stiren în acid acetic glacial, într-un balon cotat de 25 ml ; se cîntărește balonul și se calculează conținutul de stiren pe ml ; 3. Soluție standard de lucru : se diluează cu apă cantitatea corespunzătoare de soluție standard stoc, astfel încît să se obțină o soluție în care 1 ml = 250 μg stiren.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 0,1 litri/minut prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 3 ml H_2SO_4 conc. Volumul minim de aer necesar pentru o probă este de 1 litru (se recoltează, în general, pînă ce acidul sulfuric din primul microabsorbitor se colorează în galben).

Modul de lucru

Se reunește conținutul microabsorbitoarelor prin transvazare într-o eprubetă și se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = 470 nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu acid sulfuric conc.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 250 μg stiren, prin puncte din 50 în 50, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C, a stirenului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg stiren/m^3 aer :

$$\text{mg stiren/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația stirenului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

5. *Metoda spectrofotometrică pentru alfa-metilstiren*

Principiu

Alfa-metilstirenul, $C_6H_5-C(CH_3)=CH_2$, reacționează cu acetatul de mercur, formînd un compus organometalic. Ionii de mercur în exces reacționează cu difenilcarbazida, dînd un complex albastru-violet.

Sensibilitatea metodei este de 2 μg/ml. Reacția nu este specifică.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : alcool metilic ; 2. Acid acetic glacial ; 3. Acetat de mercur : se dizolvă 0,1 g oxid de mercur în 10 ml acid acetic și se aduce la 200 ml cu alcool metilic ; 4. Difenilcarbazidă 1% în alcool metilic. Se prepară extemporaneu ; 5. Soluție standard : se prepară o soluție de alfa-metilstiren în alcool metilic, care să conțină 20 μg la 1 ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 1 litru de aer, cu un debit de 0,1 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește prin transvazare conținutul microabsorbitoarelor într-o eprubetă gradată și se completează volumul la 10 ml cu alcool metilic. Se iau 5 ml soluție, se adaugă 0,2 ml acetat de mercur, se agită și după 5 minute se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 570$ nm în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 50 μg, prin puncte din 10 în 10, în condițiile de mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C, a alfa-metilstirenului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg alfa-metilstiren/m³ aer :

$$\text{mg alfa-metilstiren/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația alfa-metilstirenului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

D. **Dozarea din sînge și urină**

1. *Metoda gazcromatografică pentru benzen și toluen*

Principiu

Metoda se bazează pe separarea benzenului și toluenului din sînge prin evaporarea în vas închis și introducerea în gazcromatograf a unui volum cunoscut de gaz de deasupra probei de analizat. Metoda este bazată pe ipoteza stabilirii echilibrului fazelor.

Sensibilitatea metodei este de ordinul ng/probă.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi

1. Benzen CHR. 2. Toluen CHR. 3. Sulfură de carbon CHR.

Recoltarea probelor

Se recoltează sîngele în vase perfect spălate și uscate, prevăzute cu dopuri etanșe și conținînd 50 mg fluorură de sodiu (pentru 5 ml sînge) și cîteva perle de sticlă. După recoltare, vasul se agită energic pentru împiedicarea coagulării.

Modul de lucru

Se pipetează 1—2 ml sînge direct într-un microvas cu fundul plat, cu dop perfect etanș. Vasul cu proba se încălzește la 80°C timp de 10 minute. Imediat după încălzire se introduce în gazcromatograf un volum cunoscut de gaz pe deasupra probei de analizat, cu ajutorul unei seringi Hamilton (2 μl). Temperatura de 80° nu trebuie depășită.

Condiții gazcromatografice

Condițiile 1—8 sînt aceleași ca la dozarea din aer (C). 9. Limita de detecție: benzen 0,217 ng/μl, toluen 0,433 ng/μl.

Calcul și exprimare

Evaluarea cantitativă se face prin calibrare directă, reprezentînd grafic înălțimea picurilor față de concentrația introdusă. Curba prezintă un domeniu larg al liniarității, pînă la 10^{-10} g/μl. Recuperările pentru limita inferioară sînt de 91% pentru benzen și de 85% pentru toluen.

Rezultatele se exprimă în μg benzen/100 ml sînge și μg toluen/100 ml sînge.

Observații

Hidrocarburile aromatice prezente în atmosfera din laborator falsifică rezultatele.

Interpretarea rezultatelor

Benzenul și toluenul sînt absenți din sîngele persoanelor neexpuse, încît concentrații oricît de mici, găsite în sînge, denotă expunerea persoanelor la acești toxici.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru fenolii totali din urină* (v. Fenolul).

3. *Metoda pentru determinarea sulfat-indexului*

Principiu

Sulfat-indexul este raportul dintre sulful anorganic (eliminat prin urină sub formă de sulfați) și sulful total (anorganic și sub formă de sulfoconjugați).

Sulful urinar se dozează măsurînd turbiditatea produsă prin reacția sulfaților cu clorură de bariu, în mediu acid.

Reactivi

1. Acid clorhidric d = 1,19 și diluat 1:10 (v/v); 2. Clorură de bariu, soluție 10% în soluție de polivinilpirolidin 1,5%.

Modul de lucru

Sulf anorganic: la 0,5 ml urină se adaugă 1 ml HCl 1:10, 5 ml apă și 0,5 ml $BaCl_2$. Se agită și după 30 minute se măsoară turbiditatea la 660 nm în cuvă de 1 cm, se notează Ea.

Scanned with OKEN Scanner

Sulf conjugat + sulf anorganic : la 5 ml urină se adaugă 2,5 ml HCl d = 1,19 și 2,5 ml apă. Se menține în baia de apă la fierbere 15 minute. Se răcește și se aduce la 25 ml cu apă. Se iau 2,5 ml lichid, 4 ml apă și 2,5 ml $BaCl_2$. Se agită și după 30 minute se măsoară turbiditatea, Eb, la 660 nm în cuva de 1 cm, în compensație cu 2,5 ml lichid de hidroliză și 6,5 ml apă.

Calcul

Nu este necesară o etalonare, întrucît interesează numai raportul turbidităților :

$$\text{sulfat-index} = \frac{Ea}{Eb}$$

Interpretarea rezultatelor

În mod normal sulfat-indexul este $\geqslant 0{,}85$. El este scăzut în caz de absorbție recentă de benzen, ca și de alte substanțe care se detoxifică prin sulfoconjugare (cetone ciclice, crezoli, fenoli, naftalină, sulfură de carbon etc.). Pentru o interpretare corectă a rezultatelor, se recomandă determinarea sulfat-indexului la subiecții expuși înainte și după expunere ; deci se recoltează urina de dimineață (înainte de intrarea în tură) și apoi urina la sfîrșitul turei (pînă la 3 ore de la expunerea probabilă).

4. *Metoda spectrofotometrică în U.V. pentru acidul hipuric*

Principiu

Acidul hipuric — produs de metabolizare a toluenului, rezultat din conjugarea acidului benzoic cu glicocolul — are un maximum de absorbție la 227 nm. Acidul uric are două maxime : 227 nm și 287 nm. Deci în prezența ambilor acizi :

E_{227} = acid hipuric + acid uric ; E_{287} = acid uric (singur)

Deoarece raportul dintre maximele acidului uric este constant, $E_{228} = 0{,}73 \times E_{287}$, se poate calcula valoarea absorbției acidului uric la 227 nm și scădea din valoarea absorbției totale (acid uric + acid hipuric), obținîndu-se absorbția datorată numai acidului hipuric. Determinarea extincțiilor în U.V. se face pe eluatul apos obținut din separarea acidului uric de acidul hipuric, pe rășină schimbătoare de ioni.

Sensibilitatea metodei este de 1 μg/ml. Metoda este specifică.

Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 1 N ; 2. Acid clorhidric 1 N ; 3. Rășină Dowex, 50, granulație 50—200 mesh. Se condiționează rășina menținînd-o în NaOH 1 N timp de 24 ore, apoi spălînd-o repetat cu apă distilată, pînă ce apa de spălare rămîne neutră. Se menține în HCl 1 N timp de 24 ore, apoi se spală repetat, pînă ce apa de spălare rămîne neutră. Se păstrează sub strat de apă, la frigider ; 4. Soluție standard de acid hipuric (1 ml = 1 mg) ; 5. Coloane de lucru : seringi de plastic de 10 ml.

Modul de lucru

Separarea : rășina Dowex 50 reține substanțele interferente, lăsînd să treacă numai acizii uric și hipuric. Se introduce în coloane un strat de rășină de 3 ml. Se așază sub coloane eprubete gradate de 20 ml pentru cule-

Scanned with OKEN Scanner

gerea efluentului. Se pipetează în coloane 1 ml urină proaspăt recoltată diluată 1:10 cu apă. După ce a pătruns complet în rășină, se adaugă porțiuni succesive de apă, pînă cînd în eprubetă s-au recoltat aproximativ 19 ml efluent (P) și se completează la 20 ml cu apă. Pe altă coloană se trece 1 ml soluție standard diluată 1:10 cu apă, apoi apă pînă cînd în eprubetă s-au adunat aproximativ 19 ml lichid (S) și se completează la 20 ml cu apă. Pe a treia coloană se trece numai 1 ml apă, obținîndu-se blancul (B).

Măsurarea absorbțiilor : se citește în U.V., în cuve de cuarț de 1 cm, la $\lambda = 287$ nm. Se pune proba (P) în cuva din dreapta și se măsoară EP la 227 nm și la 287 nm. Se procedează la fel pentru standard (S), obținîndu-se ES.

Calcul

Rezultatele se exprimă în g acid hipuric/litru urină.

Se calculează extincția acidului uric la 227 nm :

$$E_{AU-227} = 0{,}73 \times E_{287}$$

și se scade din E_{227} citită (AU + AH), deci :

$$EP_{AH} = E_{(AU+AH)-227} - 0{,}73 \times E_{AU-287}$$

Se calculează astfel EP_{AH} și ES_{AH} (pentru standard, E_{287} trebuie să fie zero, deci se ia ES_{227} fără corecție).

Deoarece standardul reprezintă 1 g acid hipuric/litru urină,

$$\text{g acid hipuric/litru urină} = \frac{EP_{AH}}{ES_{AH}}$$

II.4.2. HIDROCARBURILE ALIFATICE HALOGENATE

A. Izolare

Hidrocarburile alifatice halogenate se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice, prin distilare, antrenare cu vapori de apă sau cu aer cald.

B. Identificare

— Hidrocarburi alifatice clorurate, în general :

1. *Evidențierea clorurii de cupru :* o bandă de hîrtie de filtru se îmbibă cu sulfat de cupru 1%, se usucă, se umectează cu soluția de analizat și se incinerează : flacăra verde denotă prezența $CuCl_2$, volatilă.

— Hidrocarburi alifatice halogenate conținînd gruparea $-CH_3$:

1. *Evidențierea formaldehidei :* soluția de analizat se tratează cu permanganat de K sau bicromat de K care oxidează $-CH_3$ la $-CHO$, identificată cu reactiv Schiff sau acid cromotropic (v. Formaldehida).

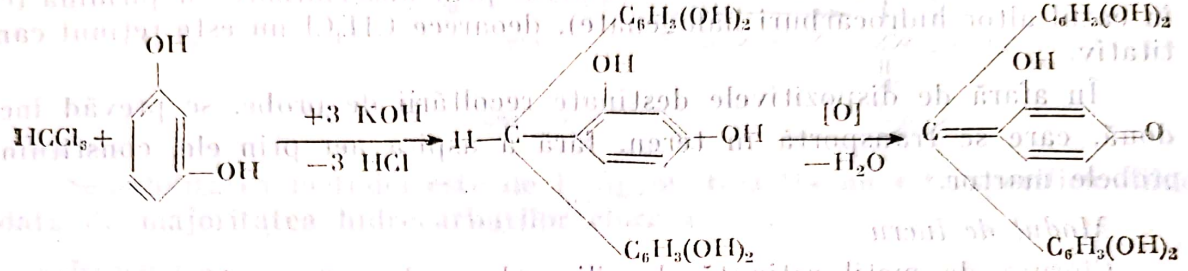
— Cloroformul (și alte hidrocarburi alifatice clorurate) :

1. *Reacția Fujiwara :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml NaOH 30% și 0,5 ml piridină (proaspăt distilată). La încălzire ușoară, stratul piridinic se colorează în violet. Se evită încălzirea prelungită, deoarece soluția se decolorează sau chiar trece în galben ; în acest caz, se adaugă, la

soluția galbenă, benzidină clorhidrică și se acidulează cu acid acetic diluat, cînd apare culoarea violetă sau chiar un precipitat. Sensibilitatea reacției este de 1 μg.

2. *Reacția Hoffman* (v. Amine aromatice)

3. *Reacția aurinelor :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă 2—3 picături rezorcină 0,5% și 4—5 picături NaOH 10%. Se încălzește cîteva minute, cînd apare o coloratie aurie :



4. *Reacția Lustgarten :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă puțină pulbere de β-naftol, apoi 0,5 ml NaOH 10% și se încălzește ușor, cînd apare o coloratie albastră.

5. *Reacția Sivadjan :* se tratează 1 ml soluție de analizat cu 3 ml soluție alcoolică de pirocatehină 5%, 0,5 ml NaOH 30% și un vîrf de spatulă de pulbere de cupru. Se încălzește la 60—80°C timp de un minut. Supernatantul albastru-verzui se decantează și se acidulează cu HCl 0,1 N. În prezența $HCCl_3$ apare o coloratie galbenă, iar în prezența CCl_4, o coloratie roșie-violacee, care la alcalinizare trece în albastru.

— Cloralul (tricloracetaldehida) :

1. *Reacția cu rezorcină :* la soluția de analizat se adaugă soluție 1% de rezorcină și soluție saturată de Na_2CO_3. În prezența cloralului apare o fluorescență verde, care lipsește în cazul cloroformului.

2. *Reacția Nessler :* se adaugă la soluția de analizat cîteva picături de reactiv Nessler cînd, în prezența cloralului, apare un precipitat galben-portocaliu, absent în cazul cloroformului. Reacție pozitivă se obține și pentru amoniac și unele amine alifatice și aromatice.

3. *Reacția Jaworowski :* se tratează 2 ml soluție de analizat cu puțină pulbere de fluoroglucină și 1 ml KOH 10%, cînd apare o coloratie brună intensă. La agitare cu HCl și alcool amilic, coloratia brună trece în stratul organic.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru clorura de metil*

Principiu

Clorura de metil reacționează cu piridina în mediu alcalin (reacția Fujiwara) dînd un complex galben-brun, colorimetrabil.

Sensibilitatea reacției este de 10 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de majoritatea hidrocarburilor clorurate.

Reactivi

1. Silicagel granulat (Brokmann); 2. Piridină (proaspăt distilată); 3. Alcool de 96°; 4. Hidroxid de sodiu soluție 1 N; 5. Soluție standard stoc : se barbotează CH_3Cl în alcoolul dintr-un balon cotat, cîntărit în prea-

labil, și se completează la semn cu alcool. Se calculează conținutul de CH_3Cl pe ml ; 6. Soluție standard de lucru : se diluează cu piridină un alicot din soluția standard stoc, pentru a obține o soluție cu 0,5 mg CH_3Cl/ml.

Recoltarea probelor

Se recoltează minimum 10 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un tub în U conținînd un strat de 5 cm de silicagel granulat. În timpul recoltării, tubul se menține într-un vas cu gheață și sare, pînă la înălțimea coloanei de silicagel. Nu se recoltează aerul prin absorbitoare cu piridină (ca în cazul altor hidrocarburi halogenate), deoarece CH_3Cl nu este reținut cantitativ.

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Clorura de metil reținută de silicagel se eluează cu 10 ml piridină. Eluatul se culege într-o eprubetă gradată cu dop rodat și, dacă este cazul, se completează la 10 ml cu piridină. Pentru dozare, se iau 5 ml, se adaugă 0,2 ml NaOH 1 N și se menține 10 minute într-o baie de apă la fierbere, apoi se răcește la robinet.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se compară imediat coloratia galben-brună cu scara de standarde, întocmită între 0 și 0,5 mg CH_3Cl, în modul următor : în 6 eprubete se iau : 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ml soluție standard de lucru, se completează cu piridină la 5 ml și se prelucrează ca mai sus. Din cantitatea de CH_3Cl aflată pentru probe, se scade cantitatea aflată pentru martor, apoi se înmulțește cu 2 (s-a lucrat cu 1/2 din soluția de piridină), obținîndu-se concentrația C a CH_3Cl, în mg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CH_3Cl/m^3 aer :

$$\text{mg } CH_3Cl/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1.000$$

în care :

C = concentrația CH_3Cl, în mg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

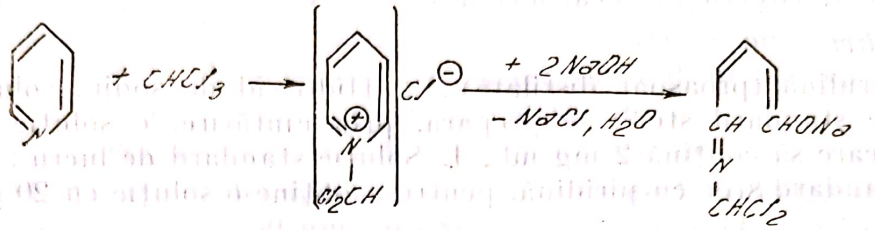
Observații

1. În lipsa CH_3Cl, pentru prepararea soluției standard, se poate folosi o scară artificială de comparație. Se prepară o soluție de coloranți din 6 ml soluție 0,05% Bismark-braun și 5 ml soluție albastru de bromtimol la 50 ml alcool etilic. Se măsoară în 7 eprubete : 0 ; 0,05 ; 0,2 ; 0,7 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5 ml soluție de coloranți și se completează cu apă la 5 ml. Etaloanele corespund la : 0 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,30 ; 0,40 și 0,50 mg CH_3Cl. 2. Sticlăria de laborator utilizată trebuie să fie perfect uscată.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru cloroform*

Principiu

Cloroformul reacționează cu piridina în mediu alcalin (reacția Fujiwara), dînd un complex roșu colorimetrabil. Piridina fixează $CHCl_3$ la azot, apoi NaOH clivează ciclul benzenic, rezultînd un derivat al aldehidei glutaconice :



Sensibilitatea metodei este de 1 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de majoritatea hidrocarburilor clorurate.

Reactivi

1. Piridină (proaspăt distilată) ; 2. Hidroxid de sodiu, soluție 0,02 N ; 3. Soluție standard stoc : se prepară prin cîntărire, o soluție de cloroform în piridină cu conținut de ordinul 1 mg/ml ; 4. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu piridină, pentru a obține o soluție cu 10 μg cloroform/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 2 litri aer cu un debit de 0,2 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 2 ml piridină.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două cu cîte 2 ml piridină, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se cu piridină la 5 ml. Se adaugă 1 ml NaOH 0,02 N, se omogenizează, se închide cu dop de vată învelit în polietilenă și se încălzește 5 minute într-o baie de apă la 90°C. Se răcește și se adaugă 5 ml apă.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția după 10 minute la spectrofotometru, la $\lambda = 540$ nm, în cuva de 2 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 50 μg cloroform, prin puncte din 10 în 10, în condițiile de mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a cloroformului, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg cloroform/m³ aer :

$$\text{mg cloroform/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația cloroformului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda spectrofotometrică pentru tetraclorura de carbon*

Principiu

Tetraclorura de carbon reacționează cu piridina în mediu alcalin (reacția Fujiwara), dînd un complex roșu colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 3 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de majoritatea hidrocarburilor clorurate.

Reactivi

1. Piridină (proaspăt distilată); 2. Hidroxid de sodiu, soluție 0,1 N; 3. Soluție standard stoc: se prepară, prin cîntărire, o soluție de CCl_4 în piridină, care să conțină 2 mg/ml; 4. Soluție standard de lucru: se diluează soluția standard stoc cu piridină, pentru a obține o soluție cu 20 μg CCl_4/ml.

Recoltarea probelor

Se procedează ca la $CHCl_3$, însă debitul este de 0,1 litri/minut.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul microabsorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se cu piridină la 5 ml. Se adaugă 0,2 ml NaOH, se omogenizează, se închide cu dop de vată învelit în polietilenă și se încălzește 15 minute într-o baie de apă la 90°C. Se răcește și se adaugă 2,5 ml apă.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția imediat la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg CCl_4 prin puncte din 20 în 20, în condițiile de mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C, a tetraclorurii de carbon, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CCl_4/m^3 aer:

$$\text{mg } CCl_4/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația tetraclorurii de carbon, în μg;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

4. *Metoda spectrofotometrică pentru tricloretilenă*

Principiu

Tricloretilena reacționează cu piridina în mediu alcalin (reacția Fujiwara), dînd un complex roșu colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 3,3 μg/ml. În condițiile indicate, metoda este specifică.

Reactivi

1. Piridină (proaspăt distilată). 2. Hidroxid de sodiu, soluție 0,02 N. 3. Soluție standard stoc: se prepară prin cîntărire, o soluție de tricloretilenă în piridină, care să conțină 2 mg/ml. 4. Soluție standard de lucru: se diluează soluția standard stoc cu piridină, pentru a obține o soluție cu 50 μg tricloretilenă/ml.

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea probelor

Se procedează ca la cloroform, însă debitul este de 0,15 litri/minut.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul microabsorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se cu piridină la 10 ml. Se iau 5 ml, se adaugă 1 ml soluție NaOH 0,02 N, se închid eprubetele cu dopuri de vată învelite în polietilenă și, *exact* după 1 minut de la adăugarea NaOH, se pun într-o baie de apă la 60—70°C timp de 5 minute. Se răcesc imediat în apă cu gheață și, *exact* după un minut, se adaugă 2 ml apă și se agită.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincțiile, în primele 2 minute de la adăugarea apei, la spectrofotometru la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg tricloretilenă, prin puncte din 20 în 20, în condițiile de mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon și se înmulțesc cu 2 (s-a lucrat cu 1/2 din probă), obținîndu-se concentrația C a tricloretilenei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg tricloretilenă/m³ aer :

$$\text{mg tricloretilenă/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația tricloretilenei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Sticlăria utilizată trebuie să fie perfect uscată. 2. Timpii indicați trebuie respectați întocmai. 3. Dacă se obțin concentrații peste 100 μg/probă, se repetă determinarea cu un alicot mai mic din soluția absorbantă.

5. *Metoda spectrofotometrică pentru 1,2-dicloretan*

Principiu

1,2-dicloretanul încălzit cu soluție apoasă de piridină, răcit brusc și apoi alcalinizat, dă un complex roșu colorimetrabil (reacția Fujiwara modificată).

Sensibilitatea metodei este de 3 μg/ml. Specificitatea este asigurată de ordinea operațiilor descrise anterior ; în aceste condiții, nu interferă tetraclorura de carbon, cloroformul, tricloretilena și etilenclorhidrina ; interferă însă clorul în concentrație depășind 3 ppm.

Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 1 N. 2. Piridină, soluție apoasă : la 120 ml apă se adaugă piridină pînă la 1 000 ml (piridina trebuie să fie incoloră ; în caz contrar, se distilă). 3. Alcool etilic p.a. 4. Soluție standard stoc : se prepară prin cîntărire o soluție de 1,2-dicloretan, care să conțină 0,5 mg/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 2 litri de aer, cu un debit de 1 litru/minut, printr-un absorbitor conținînd 15 ml soluție apoasă de piridină.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 15 ml soluție apoasă de piridină, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul absorbitoarelor în eprubete gradate și se completează la 20 ml cu soluție apoasă de piridină. Se introduc eprubetele într-o baie de apă la 70°C, timp de 15 minute. Se răcesc în apă cu gheață și se adaugă cîte 0,8 ml NaOH 1 N. Se agită și se mențin la rece timp de 5 minute. Se aduce volumul la 30 ml cu alcool etilic și se agită.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru la $\lambda = 415$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 1,5 mg dicloretan, prin puncte din 0,5 în 0,5, în condițiile de mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a dicloretanului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg dicloretan/m³ aer :

$$\text{mg dicloretan/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația dicloretanului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

6. *Metoda spectrofotometrică pentru clorura de vinil*

Principiu

Clorura de vinil este oxidată, cu permanganat și acid periodic, la formaldehidă, care este dozată colorimetric cu acid cromotropic (v. Formaldehida).

Sensibilitatea metodei este de 10 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferă formaldehida și acroleina.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : volume egale de acid acetic glacial și alcool etilic absolut ; 2. Amestec oxidant : 1 ml permanganat de potasiu 2% și 1 ml acid periodic 1,5% în 25 ml apă. Se prepară extemporaneu ; 3. Sulfit de sodiu, $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$, soluție 30% ; 4. Acid cromotropic. Se dizolvă 0,1 g acid cromotropic în 10 ml H_2SO_4 10% apoi se mai adaugă 120 ml H_2SO_4 d=1,84 ; 5. Soluție standard stoc : într-un balon cotat de 25 ml, care conține 10 ml soluție absorbantă, se adaugă 2—3 picături de clorură de vinil (dintr-o butelie de clorură de vinil lichefiată), se cîntărește, se aduce la semn cu soluție absorbantă și se calculează conținutul de clorură de vinil pe ml ; 6. Soluție standard de lucru : se diluează un alicot din soluția standard stoc cu soluție absorbantă, pentru a obține o soluție cu 400 μg clorură de vinil/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 5 litri de aer, cu un debit de 0,2 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 0,5 ml soluție absorbantă și 2 ml amestec oxidant. Amestecul oxidant se adaugă în microabsorbitoare în momentul recoltării.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Se transvazează conținutul microabsorbitoarelor într-o eprubetă gradată și se adaugă soluție de sulfit de sodiu, cu picătura, pînă la decolorare. Se adaugă 3,5 ml soluție de acid cromotropic, se omogenizează, se introduce eprubeta într-o baie de apă la fierbere, menținîndu-se 30 minute. Se răcește sub jet de apă rece și se completează la 10 ml cu apă.

În mod similar se prelucrează o probă martor a reactivilor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru la $\lambda = 574$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 400 μg, prin puncte din 100 în 100 (din 0,5 ml soluție absorbantă, 2 ml amestec oxidant și cantitățile corespunzătoare de standard de lucru, apoi se prelucrează ca mai sus). Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a clorurii de vinil, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg clorură de vinil/m³ aer:

$$\text{mg clorură de vinil/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația clorurii de vinil, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

D. Dozare din sînge și urină

1. *Metoda gazcromatografică pentru clorură de metilen, cloroform, tetraclorură de carbon*

Principiu

Metoda se bazează pe separarea CH_2Cl_2, $CHCl_3$, CCl_4 din sînge și urină prin evaporarea în vas închis și introducerea în gazcromatograf a unui volum cunoscut de gaz de deasupra probei de analizat. Metoda este bazată pe ipoteza stabilirii echilibrului fazelor.

Sensibilitatea metodei, prin utilizarea detectorului specific, cu captură de electroni, este de ordinul ng/μl.

Reactivi

1. Tetraclorura de carbon CHR. 2. Cloroform CHR. 3. Clorură de metilen CHR. 4. n-heptan CHR.

Recoltarea probelor

Sîngele se recoltează așa cum s-a arătat la benzen și toluen.

Urina se recoltează (o singură emisiune sau din 24 ore) în vase perfect uscate, prevăzute cu dopuri etanșe.

Modul de lucru

Se pipetează 1—2 ml sînge sau 2—4 ml urină direct într-un microvas cu fundul plat, prevăzut cu dop etanș. Vasul cu proba este încălzit la 80°C timp de 5 minute. Imediat după încălzire se introduce în gazcromatograf un volum cunoscut de gaz de deasupra probei de analizat cu ajutorul unei microseringi Hamilton (50 μl). Temperatura de 80°C nu trebuie depășită.

Scanned with OKEN Scanner

Condiții cromatografice

1. Aparat Carlo Erba, model Fractowap 2400 T
2. Detector : Captură de electroni Ni-63
3. Coloana : 2 m × 3 mm diametru interior, din sticlă
4. Faza staționară : OV_1 — 0,57% ; QFI — 0,5% ; OV_{17} — 0,5%/chromosorb W.H.P. 100—120 mesh (se pot folosi și alte faze staționare, ca de exemplu, 10% carbowax 20 M/Chromosorb W silanizat).
5. Temperatura : coloană 25°C ; 45°C ; detector : 250°C ; vaporizator: 90°C
6. Gaz purtător : azot cu debit de 80 ml/minut
7. Timp de reținere : CCl_4 — 1'20'' ; $CHCl_3$ — 3'50'' ; CH_2Cl_2 — 2'17''
8. Limita de detecție : CCl_4 — 0,008 ng/µl urină ; 0,079 ng/µl sînge ; $CHCl_3$ — 0,014 ng/µl urină ; 0,074 ng/µl sînge ; CH_2Cl_2 — 0,013 ng/µl urină.

Calcul și exprimare

Evaluarea cantitativă se realizează prin calibrare directă, reprezentînd grafic înălțimea picurilor față de concentrația introdusă. Curba prezintă un domeniu larg al liniarității pînă la 10^{-11} g/µl. Recuperările pentru limita inferioară au fost de 75% (urină) și 93% (sînge) pentru CCl_4 ; 70% (urină) și 75% (sînge) pentru $CHCl_3$; 80% (urină) pentru CH_2Cl_2.

Rezultatele se exprimă în µg/100 ml sînge și µg/litru urină.

Observații

Hidrocarburile clorurate prezente în atmosfera laboratorului sau în frigiderul unde se păstrează probele recoltate falsifică rezultatele.

Interpretarea rezultatelor

Tetraclorura de carbon, cloroformul, clorura de metilen sînt absenți din sîngele și urina persoanelor neexpuse, încît concentrații, oricît de mici, găsite în sînge și urină, denotă expunerea persoanelor la acești toxici.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru compușii triclorotolali*

Principiu

Compușii triclorurați se elimină prin urină sub formă conjugată. Aceștia sînt hidrolizați și oxidați la acid tricloracetic, determinat prin reacția Fujiwara, rezultatul exprimînd totalitatea compușilor triclorurați.

Reactivi

1. Piridină : dacă nu este complet incoloră, se distilă, folosind fracțiunea care distilă la 116°C (atenție la distilare, piridina este inflamabilă). 2. Hidroxid de sodiu, soluție 30%. 3. Soluție oxidantă : se dizolvă la cald 2 g bicromat de potasiu în 20 ml apă și, după răcire, se adaugă, în porțiuni mici, 80 ml acid sulfuric d=1,84. 4. Soluție standard stoc : se cîntărește repede aproximativ 0,5 g acid tricloracetic (uscat în exsicator minimum 24 ore) și se dizolvă în 250 ml apă. Se stabilește concentrația exactă în acid tricloracetic prin titrare cu o soluție de NaOH sau Na_2CO_3 0,01 N. 5. Soluție standard de lucru :

Scanned with OKEN Scanner

se diluează soluția standard stoc cu apă pentru a obține o soluție cu 0,15 mg acid tricloracetic/ml.

Recoltarea probelor

Se recoltează o singură emisiune de urină (spot) sau urina din 24 ore.

Modul de lucru

În eprubete cu dop rodat se pipetează probele (P) și un blanc (B) la fiecare serie, după următoarea schemă :

Eprubeta/reactivii	*P*	*B*
Urină (ml)	0,3	—
Apă (ml)	—	0,3
Soluție oxidantă (ml)	0,5	0,5
Se mențin 15 minute în baia de apă la 70°C, se răcesc brusc în apă cu gheață și se adaugă :		
Hidroxid de sodiu (ml)	3	3
Piridină (ml)	3,5	3,5
Se agită energic, se mențin în baie la 70°C timp de 15 minute, se răcesc în apă cu gheață. După separarea fazelor, se pipetează în alte eprubete :		
Supernatant (ml)	3,75	3,75
Apă (ml)	0,75	0,75

Se omogenizează și se mențin în apă cu gheață pînă la măsurarea extincțiilor (maximum 15 minute).

Se măsoară extincția probelor (EP) și a blancului (EB) față de apă, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm.

Pentru întocmirea curbei de etalonare se iau din soluția standard de lucru : 0,1 ; 0,2 și 0,3 ml, se completează cu apă la 0,3 ml, obținînd concentrații de acid tricloracetic de 15, 30 și 45 µg/probă. Se lucrează identic cu probele. Se trasează curba etalon și se calculează factorul de pantă, A.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acid tricloracetic/litru urină :

$$\text{mg acid tricloracetic/litru urină} = \frac{EP - EB}{0,3} \cdot A$$

Interpretarea rezultatelor

Se compară rezultatele obținute cu acelea de la un lot martor (muncitori neexpuși la hihrocarburi alifatice clorurate).

II.4.3. ALCOOLII ȘI GLICOLII

A. Izolare

Alcoolii și glicolii (volatili) se izolează din aer prin reținere în soluții adecvate, iar din produse biologice și alte produse (în funcție de proprietățile lor fizice) prin distilare, antrenare cu aer cald sau microdifuzie în celule Conway sau Mezincescu.

B. Identificare

— Metanolul :

1. *Reacția Kolthoff-Denigès :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml acid fosforic 25% și 0,5 ml $KMnO_4$ 2%. După 10 minute se distruge excesul de $KMnO_4$ cu perhidrol 12% (v/v) sau cu sulfit de sodiu 15% adăugat cu picătura pînă la decolorarea soluției, evitînd excesul de permanganat sau sulfit. În lichid se identifică formaldehida (v. Formaldehida) :

$$5\ CH_3OH + 2\ KMnO_4 + 4\ H_3PO_4 = 5\ HCHO + 2\ MnHPO_4 + 2\ KH_2PO_4 + 8\ H_2O$$

$$2\ KMnO_4 + 5\ Na_2SO_3 + 4\ H_3PO_4 = 5\ Na_2SO_4 + 2\ MnHPO_4 + 2\ KH_2PO_4 + 3\ H_2O$$

În cazul prezenței concomitente a *formaldehidei*, aceasta se îndepărtează astfel : se tratează 10 ml soluție de analizat cu 5 ml $AgNO_3$ 10% și 5 ml NaOH 30%. Se încălzește cu refrigerent ascendent timp de 10 minute și se distilă. Formaldehida se oxidează la acid formic, care nu distilă, și, concomitent, Ag_2O se reduce la Ag metalic (oglindă de argint).

$$AgNO_3 + NaOH = AgOH + NaNO_3$$

$$2\ AgOH = Ag_2O + H_2O$$

$$HCHO + Ag_2O = HCOOH + 2\ Ag$$

În cazul identificării metanolului în *sînge* se procedează astfel : se tratează 2 ml sînge cu 2 ml acid tricloracetic 20%, se centrifughează și peste 1 ml supernatant se adaugă 0,2 ml $KMnO_4$ 1% și 0,1 ml acid fosforic 85%. Se agită 1 minut, se reduce excesul de $KMnO_4$ cu cîteva cristale de bisulfit de sodiu. Se adaugă 1 ml acid cromotropic 1% în acid sulfuric conc. și apoi, cu grijă, 1 ml acid sulfuric conc. La zona de contact a fazelor se observă un inel violet, iar la agitare, coloratia difuzează. În absența metanolului, apare o coloratie brun-deschis.

2. *Reacții de esterificare :* a) Se încălzește 1 ml soluție de analizat cu 0,1 g acid salicilic și 1 ml acid sulfuric conc : se dezvoltă un miros specific de salicilat de metil, $C_6H_4(OH)COOCH_3$. b) Se adaugă, la 2 ml soluție de analizat, 2—3 picături de clorură de benzil (sau cîteva cristale de acid benzoic) și 0,5 ml H_2SO_4 conc. Se neutralizează cu NaOH 20% cînd se dezvoltă un miros specific de benzoat de metil, $C_6H_5COOCH_3$.

— *Etanolul :*

1. *Reacția Lieben :* se alcalinizează 2 ml soluție de analizat cu NaOH 10% sau Na_2CO_3 10%, se încălzește ușor și se adaugă soluție Lugol (4 g iod și 4 g KI la 100 ml apă) pînă la apariția culorii galbene-portocalie. Se distruge excesul de iod cu NaOH 10% sau Na_2CO_3 10%, cînd apare opalescență și

miros de iodoform, caracteristic, sau chiar precipitat galben cu forme caracteristice la microscop (la concentrații mari de etanol).

$$C_2H_5OH + I_2 + 2\,NaOH = CH_3CHO + 2\,NaI + 2\,H_2O$$

$$CH_3CHO + 3\,I_2 + 3\,NaOH = CI_3CHO + 3\,NaI + 3\,H_2O$$

$$CI_3CHO + NaOH = CHI_3 + HCOONa$$

Reacția este sensibilă, dar nespecifică, fiind dată și de acetonă și metiletilcetonă, precum și de acetaldehidă. Diferențierea cetonelor de etanol și acetaldehidă se realizează, dacă soluția de analizat este alcalinizată cu amoniac în loc de NaOH, după care se adaugă soluția Lugol. În prezența etanolului și a acetaldehidei apare un precipitat cenușiu-negru de iodură de azot, pe cînd acetona, în aceleași condiții, dezvoltă miros de iodoform.

2. *Reacția xantogenaților* (v. Sulfura de carbon)

3. *Reducerea dicromatului de potasiu :* se tratează 2 ml soluție de analizat cu cîteva picături $K_2Cr_2O_7$ 5% și 1 ml H_2SO_4 conc, cînd se dezvoltă o culoare verde (Cr^{3+}), iar etanolul se oxidează, în funcție de condițiile de reacție, la acetaldehidă sau acid acetic :

— la rece :

$$3\,CH_3CH_2OH + K_2Cr_2O_7 + 4\,H_2SO_4 = 3\,CH_3CHO + Cr_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 7\,H_2O$$

— la cald :

$$3\,CH_3CH_2OH + 2\,K_2Cr_2O_7 + 8\,H_2SO_4 = 3\,CH_3COOH + 2\,Cr_2(SO_4)_3 + 2\,K_2SO_4 + 11\,H_2O$$

Reacția nu este specifică, fiind dată de toți alcoolii, ca și de alte substanțe organice și substanțe reducătoare.

— *Etilenglicolul :*

1. *Oxidarea la acid oxalic:* se tratează 2 ml soluție de analizat cu 0,5 ml HNO_3 conc. și se încălzește ușor : se formează acid oxalic, care decolorează soluția sulfurică de $KMnO_4$.

2. *Reacția Malaprade :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 0,5 ml acid periodic 5% ; după 20 minute se distruge excesul de acid periodic cu metaarsenit de potasiu 3% și se identifică HCHO formată.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică cu fenilhidrazină pentru metanol*

Principiu

Metanolul se oxidează, în mediu acid, cu permanganat de potasiu, la formaldehidă. Aceasta se condensează cu fenilhidrazina, trecînd în fenilhidrazonă, care cu fericianura de potasiu în mediu acid dă un compus cu structura chinoniminică, roșu, colorimetrabil :

$$CH_3OH \xrightarrow{[O]} HCHO$$

$$C_6H_5-NH-NH_2\cdot HCl + HCHO \xrightarrow[-H_2O]{K_3[Fe(CN)_6]} C=C_6H_4=N-N=CH_2\cdot HCl$$

Sensibilitatea reacției este de 0,8 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de alți alcooli și alte substanțe organice, care prin oxidare cu permanganat trec în aldehidă.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : apă distilată. 2. Alcool etilic, soluție 5%. 3. Permanganat de potasiu, soluție 5%. 4. Acid fosforic 85%, soluție 25% (v/v). 5. Perhidrol, soluție 15% (v/v). (Se prepară extemporaneu). 6. Fenilhidrazină clorhidrică, soluție 1% : se dizolvă 1 g fenilhidrazină clorhidrică în 2 ml HCl d=1,19 și se aduce la 100 ml cu apă. Se agită energic și, la nevoie, se filtrează (se prepară extemporaneu). 7. Fericianură de potasiu, soluție 2% (se prepară extemporaneu). 8. Acid clorhidric d=1,19. 9. Soluție standard stoc : se prepară, prin cîntărire, o soluție de metanol în apă, cu o concentrație de aproximativ 1 mg/ml. 10. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, pentru a obține o soluție cu 50 μg metanol/ml. Soluțiile standard nu se conservă.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 1 litru aer, cu un debit de 0,2 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 2 ml apă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, cu cîte 2 ml apă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește prin transvazare conținutul microabsorbitoarelor într-un balon cotat de 25 ml, reluînd de 3 ori cu cîțiva ml apă. Se adaugă 1 ml alcool etilic, 1 ml permanganat de potasiu și 1 ml acid fosforic. Se lasă în repaus o oră, agitînd din cînd în cînd. Se adaugă perhidrol cu picătura, pînă la decolorarea soluției, apoi 2 ml fenilhidrazină și 1 ml fericianură. Se agită și după 4 minute se adaugă 4 ml HCl și se completează la 25 ml cu apă.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a metanolului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg metanol/m³ aer :

$$\text{mg metanol/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

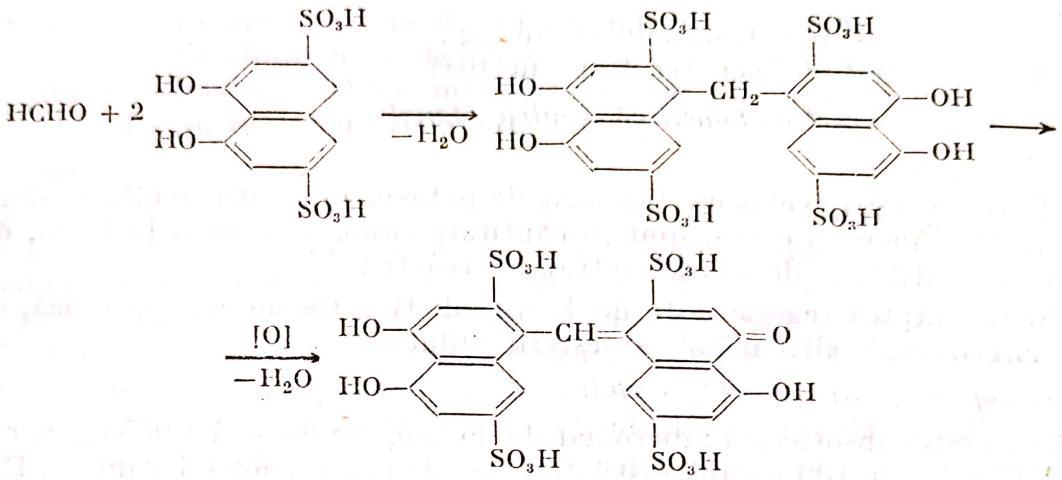
C = concentrația metanolului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Metoda spectrofotometrică cu acid cromotropic pentru metanol*

Principiu

Metanolul este oxidat la formaldehidă. Aceasta este tratată cu acid cromotropic (acid 1,8-dihidroxinaftalen-3,6-disulfonic) în mediu acid, cînd se obține un compus violet, colorimetrabil.



Sensibilitatea reacției este de 1 μg/ml.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : apă distilată. 2. Permanganat de potasiu, soluție 2%. 3. Acid fosforic, 50%. 4. Sulfit de sodiu, soluție saturată. 5. Acid cromotropic, soluție 5%, proaspăt preparată. 6. Acid sulfuric 9 M. 7. Soluție standard 1 ml = 0,1 mg metanol.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 1 litru aer, cu un debit de 0,2 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 2 ml apă distilată.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, cu cîte 2 ml apă distilată, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitorului într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se adaugă 1 ml permanganat de potasiu și 0,5 ml acid fosforic. Se lasă în repaus 15 minute, se decolorează excesul de permanganat de potasiu cu sulfit de sodiu, evitînd excesul, apoi se adaugă 5 ml acid cromotropic, agitînd și răcind la robinet. Se aduce proba în baia de apă la fierbere, menținînd-o 30 minute. Se răcește și se completează la 10 ml cu acid sulfuric 9 M.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru la $\lambda = 580$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a metanolului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg metanol/m³ aer :

$$\text{mg metanol/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația metanolului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda spectrofotometrică pentru etanol*

Principiu

Etanolul este oxidat cu dicromat de potasiu în soluție acidă. Se dozează dicromatul rămas în exces, dintr-o cantitate cunoscută luată în lucru, deducîndu-se cantitatea de etanol intrat în reacție.

Sensibilitatea reacției este de 40 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferează alți alcooli și esterii alifatici.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : dicromat de potasiu. Se dizolvă 1,0655 g dicromat de potasiu p.a. în 100 ml apă distilată și se adaugă, răcind sub robinet, 125 ml acid sulfuric d=1,84 ; după răcire se completează la 25 ml cu apă (1 ml soluție oxidează 1 ml etanol).

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 0,150 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 2 ml soluție absorbantă. Recoltarea se oprește îndată ce soluția de dicromat își schimbă intensitatea culorii, înainte de a deveni verde.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul microabsorbitorului, cantitativ, într-un balon cotat de 25 ml, reluînd cu apă pînă la semn.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 430$ nm în cuva de 1 cm, față de apa distilată, obținîndu-se extincțiile EP și extincția martorului față de apă distilată, obținîndu-se extincția EM. Se calculează cantitatea C în mg :

$$C = \frac{EM - EP}{EM} \cdot 2$$

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg etanol/m³ aer :

$$\text{mg etanol/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

în care :

C = concentrația etanolului, în mg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

4. *Metoda spectrofotometrică pentru etilenglicol*

Principiu

Etilenglicolul este oxidat cu acid periodic la formaldehidă.

Aceasta se condensează cu fenilhidrazina, formînd fenilhidrazona, care este oxidată cu fericianură de potasiu la un compus chinoniminic, roșu, colorimetrabil (v. Metanolul).

Sensibilitatea metodei este de 0,1 mg/ml. Acetaldehida, glioxalul, aldehida glicolică, etilcelosolvul, etilenclorhidrina și dietilenglicolul nu împiedică determinarea. Oxidul de etilen interferează, dar nu se poate determina selectiv, datorită mediului de recoltare diferit.

Reactivi

1. Acid sulfuric p.a. 15%. 2. Acid periodic 0,1 N. Se dizolvă 1,92 g acid periodic p.a. în apă distilată și se aduce la 100 ml. În lipsa acidului periodic, se poate folosi periodat de potasiu sau de sodiu 3% în soluție de acid sulfuric 15%. Periodatul de potasiu se dizolvă prin încălzire pînă la fierbere, iar periodatul de sodiu este solubil la rece. 3. Arsenit de sodiu 0,5 M. Se dizolvă 6,5 g arsenit de sodiu p.a. în apă distilată și se aduce la 100 ml. În lipsa arsenitului, se poate folosi anhidridă arsenioasă. Cantitatea necesară de anhidridă arsenioasă se dizolvă în 40 ml NaOH 0,1 N, se neutralizează cu HCl (reacția la turnesol), apoi se completează la 100 ml cu apă ; 4. Fenilhidrazină clorhidrică, soluție 1%. Se dizolvă 1 g clorhidrat de fenilhidrazină în 90 ml apă, căreia i se adaugă 2 ml HCl d=1,19. Dacă soluția nu este limpede, se filtrează și se completează la 100 ml cu apă. Se prepară extemporaneu ; 6. Acid clorhidric p.a. d=1,19 ; 7. Soluție standard stoc. Se cîntăresc, într-un balon cotat de 25 ml, cîteva picături de etilenglicol p.a. cu p.f. = 197,8°C în acid sulfuric 15%. Soluția trebuie să aibă concentrația de aproximativ 1 mg etilenglicol/ml ; 8. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu acid sulfuric 15%, pentru a obține o soluție cu 10 μg etilenglicol/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 5—10 litri aer, cu un debit de 0,3—0,5 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml apă distilată.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 10 ml apă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată și se completează volumul de 15 ml cu acid sulfuric 15%. Se iau cîte 5 ml și se aduc în eprubete cu dop. Se adaugă 1 ml acid periodic, se agită și se lasă în repaus 1 oră la temperatura laboratorului. Se adaugă 2 ml arsenit de sodiu și se agită. Se adaugă 5 ml fenilhidrazină, se agită, se lasă 5 minute, apoi se tratează cu 0,5 ml fericianură de potasiu. Se lasă 10 minute și se adaugă 0,5 ml HCl. Se agită.

În paralel se prelucrează probele martor.

Se măsoară extincția, după 10 minute, la spectrofotometru la $\lambda = 530$ nm, în cuvă de 2 cm, față de martor.

Scanned with OKEN Scanner

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 15 μg, prin puncte din 3 în 3, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 3 (pentru că s-a lucrat cu 1/3 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C_1 și C_2 a etilenglicolului, în μg, din cele două microabsorbitoare montate în serie.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg etilenglicol/m³ aer ;

$$\text{mg etilenglicol/m}^3 \text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V}$$

în care :

C_1 și C_2 = concentrația etilenglicolului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

5. *Metoda spectrofotometrică pentru celosolv*

Principiu

Celosolvul, $OH-CH_2-CH_2-O-C_2H_5$, formează, prin hidroliză în mediu acid, etilenglicol, care se dozează ca în metoda precedentă.

Sensibilitatea metodei este de 0,4 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferează oxidul de etilen și etilenglicolul.

Reactivi

1—6 (reactivii de la dozarea etilenglicolului). 7. Soluție standard stoc : se cîntăresc, într-un balon cotat de 25 ml, cîteva picături de celosolv în apă distilată. Soluția trebuie să aibă o concentrație de aproximativ 4 mg celosolv/ml. 8. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă, pentru a obține o soluție cu 40 μg celosolv/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 0,5 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 8 ml apă distilată.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 8 ml apă distilată, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul fiecărui absorbitor în cîte o eprubetă gradată și se completează volumul la 10 ml cu apă distilată. Se iau cîte 5 ml și se aduc în cîte un balon cu dop rodat, se adaugă 0,5 ml HCl d=1,19 și 1 ml acid periodic, apoi se aplică dopurile și se fixează cu leucoplast. Probele astfel pregătite se așază într-o baie de apă la temperatura laboratorului și se încălzesc treptat pînă la 80°C, timp în care are loc hidroliza celosolvului la etilenglicol. Se mențin probele timp de 40 minute la 80°C, pentru a se produce oxidarea la formaldehidă, se răcesc apoi la temperatura laboratorului, se adaugă, cu picătura, arsenit de sodiu, pînă la reducere totală (decolorarea probelor). Se adaugă 5 ml fenilhidrazină, se agită și se lasă 10 minute în repaus, apoi se adaugă 0,5 ml fericianură de potasiu, se agită și se lasă 3 minute în repaus și în final se adaugă 1 ml HCl d = 1,19.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Scanned with OKEN Scanner

Se măsoară extincția după 5 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 20 μg celosolv, prin puncte din 4 în 4, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2 ale celosolvului în μg, din cele două absorbitoare montate în serie.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg celosolv/m³ aer :

$$\text{mg celosolv/m}^3 \text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V}$$

în care :

C_1 și C_2 = concentrația celosolvului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Sinonime pentru celosolv: etilenglicolmonoetilester, etilglicol, 2-etoxietanol, dosanol, N. E. solvuloz. 2. În mod identic, se dozează și butilcelosolvul, folosind pentru curba etalon soluție de butilcelosolv. 3. Deoarece tonalitatea culorii este influențată de impurități, se recomandă să se execute curba standard utilizînd pentru soluție produsul industrial cel mai pur.

B. **Dozare din aer expirat, sînge, urină, organe**

1. *Metoda rapidă pentru etanol, din aerul expirat*

Se folosesc, fie tuburi umplute cu silicagel impregnate cu dicromat de potasiu sau anhidridă cromică și acid sulfuric — cînd se modifică culoarea de la galben (Cr^{6+}) la verde (Cr^{3+}), concomitent cu oxidarea etanolului la acetaldehidă — fie aparate speciale, de tipul Alcootest, Breathanalyser etc., bazate pe reacții chimice sau măsurători fizice (de exemplu absorbție în I.R.).

2. *Metoda iodometrică (oficială) pentru etanol din produse biologice (metoda Cordebard)*

Principiu

Etanolul, izolat din produsul biologic prin distilare, este oxidat, la rece, pînă la acid acetic, cu dicromat de potasiu în mediu de acid azotic. Excesul de dicromat este titrat iodometric, în prezența amidonului sau a alcoolului polivinilic ca indicator :

$$3\,C_2H_5OH + 2\,K_2Cr_2O_7 + 16\,HNO_3 = 3\,CH_3COOH + 4\,KNO_3 + 4\,Cr(NO_3)_3 + 11\,H_2O$$

$$K_2Cr_2O_7 + 6\,KI + 14\,HNO_3 = 2\,Cr(NO_3)_3 + 8\,KNO_3 + 2\,I_2 + 7\,H_2O$$

$$I_2 + 2\,Na_2S_2O_3 = 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

Reactivi

1. Acid picric, soluție saturată. Se aduc într-o capsulă 20 g acid picric, se adaugă 1 000 ml apă și se încălzește amestecul la ușoară fierbere, timp de 10—15 minute, apoi se răcește și se filtrează. 2. Acid succinic sau acid tartric, soluție 5%. 3. Acid azotic d=1,42 (lipsit de substanțe reducătoare). 4. Iodură de potasiu, soluție 2% proaspăt preparată. Se păstrează în sticle

Scanned with OKEN Scanner

brune cu dop rodat. 5. Dicromat de potasiu, soluție N/6,9 (0,144 N). Se cîntăresc exact 7,1065 g dicromat de potasiu pulverizat, în prealabil uscat la 125—150°C și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată. Soluția se conservă la întuneric. Din această soluție, 3 ml corespund la 10 ml dicromat de potasiu N/23 (0,0435 N) și oxidează 5 mg etanol. 6. Tiosulfat de sodiu, soluție N/23 (0,0435 N). Se dizolvă 11 g $Na_2S_2O_3 \cdot H_2O$ în apă distilată proaspăt fiartă și răcită, într-un balon cotat de 1 000 ml, se adaugă 0,10 g carbonat de sodiu anhidru și se completează la semn cu apă. După cîteva zile se determină titrul, care se verifică apoi săptămînal. Stabilirea titrului se face astfel: se iau 3 ml dicromat N/6,9, exact măsurați, se adaugă 5 ml apă distilată, 4 ml HNO_3 și 20 ml KI 2%. Se astupă flaconul și, după 2—3 minute, se titrează iodul pus în libertate cu tiosulfat N/23 (indicator amidon sau alcool polivinilic). Factorul se calculează după formula:

$$F_{tiosulfat} = \frac{10}{n}$$

în care:

10 = ml dicromat N/23, corespunzînd la 3 ml dicromat N/6,9;
n = ml tiosulfat N/23, folosiți la titrare.

7. Indicator amidon 1% sau alcool polivinilic 10% (se dizolvă 10 g alcool polivinilic, lipsit de substanțe reducătoare, în 100 ml apă la fierbere, se continuă încălzirea, agitînd pînă la dizolvare completă. Soluția se păstrează în flacoane bine închise, la rece).

Modul de lucru

a. *Izolarea*

Sînge: se aduc 5 ml sînge recoltat pe anticoagulant, exact măsurați, într-un balon de distilare de 300 ml, se adaugă 20 ml apă, 25 ml acid picric (sau 45 ml acid succinic) și puțină piatră ponce. Se agită ușor și se adaptează la o coloană de distilare Vigreux, care se continuă cu un refrigerent descendent, prevăzut cu o alonjă. Capătul alonjei se introduce într-un balon cotat de 25 ml, în care se găsesc 2—3 ml apă distilată. Se distilă pînă aproape la semnul balonului, apoi se completează cu apă la semn. Distilarea durează aproximativ 25 minute.

Urină: se aduc 5 ml urină, exact măsurați, într-un balon de distilare de 300 ml și se continuă ca la sînge.

Organe: se cîntărește repede o cantitate de organe (în funcție de natura organului) se mojarează cu nisip purificat și se trece în balonul de distilare, reluînd de cîteva ori cu apă, se adaugă acid picric și se continuă ca la sînge.

b. *Dozarea (metoda Cordebard modificată de Banciu și Droc):* Într-un vas conic de 100 ml cu dop rodat, se iau 5 ml distilat (în cazul sîngelui și al urinii, corespunde la 1 ml produs), se adaugă 3 ml dicromat N/6,9 (măsurați cu microbiureta) și 4 ml HNO_3 conc. Se acoperă balonul, se lasă în repaus 15 minute *exact*, se adaugă 20 ml KI 2%. După 2 minute se titrează iodul pus în libertate de excesul de dicromat, cu tiosulfat N/23, în prezența soluției de amidon sau de alcool polivinilic (ultimul virează de la roșu la incolor).

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

1 ml dicromat N/23 = 0,0005 g etanol

$$\text{g etanol/1 000 ml sînge (urină)} = (10 - n) \cdot 0{,}5 = \frac{10 - n}{2}$$

în care :

10 = ml dicromat N/23 (la care corespund 3 ml dicromat N/6,9 și care oxidează 5 mg etanol) ;

n = ml tiosulfat N/23 folosiți la titrare.

Observații

1. Dacă distilatul conține mai mult etanol decît ar putea oxida dicromatul, se ia în lucru un alicot mai mic. 2. Reactivii utilizați trebuie să fie p.a. sau chimic puri — să nu conțină substanțe reducătoare. 3. În cazul sîngelui, rezultatele sînt corecte numai dacă sîngele nu a fost putrefiat. În cazul sîngelui coagulat, se lucrează pe ser și rezultatul final se împarte cu 1,2, deoarece etanolul este repartizat în cantitate mai mică în ser decît în sîngele total. 4. În condițiile metodei, metanolul aflat eventual în produsul biologic este oxidat la rece numai în proporție de aproximativ 15%. Depistarea metanolului în sînge se face după tehnica indicată la metanol (v. Metanolul). 5. Se recomandă ca dozarea să se execute pe două probe paralele. 6. Din cauza scăderii în timp a concentrației de etanol, se recomandă să se adauge 0,15% la rezultatul analizei, pentru fiecare oră de întîrziere. Această corecție se face, neținînd seama de primele două ore și pe o perioadă care să nu depășească 5—6 ore de la recoltarea sîngelui. Peste această limită, siguranța calculului este mai redusă.

3. *Metoda enzimatică (metoda Bucher-Redetzky) pentru etanol din sînge*

Principiu

Etanolul este oxidat la acetaldehidă de către alcooldehidrogenază (ADH) în prezența acceptorului de hidrogen NAD^+. Acetaldehida este captată de semicarbazidă. Concomitent NAD^+ se reduce la NADH, a cărui concentrație, echivalentă cu cantitatea de etanol oxidat, este măsurată la 340 nm :

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \overset{ADH}{\rightleftharpoons} CH_3CHO + NADH + H^+$$

Reactivi

1. Soluție deproteinizantă: a) acid percloric 3,4% (se diluează 4,8 ml acid percloric 70% la 100 ml apă bidistilată) ; b) acid tricloracetic 0,25% în apă bidistilată ; 2. Soluție tampon pH 8,7 : 10 g pirofosfat de sodiu, $Na_4P_2O_7 \cdot 10\,H_2O$, 2,5 g semicarbazidă clorhidrică, 0,5 g glicocol, apă bidistilată qs. ad 100 ml. Se adaugă 10 ml NaOH 2 N și se completează la 300 ml cu apă bidistilată. Soluția este stabilă 3 săptămîni la frigider ; 3. Soluție de ADH. Se dizolvă 30 mg ADH cristale în 1 ml apă bidistilată. Soluția este stabilă 2 săptămîni la frigider ; 4. Soluție de NAD. Se dizolvă 100 mg NAD cristale în 6 ml apă bidistilată. Soluția este stabilă 4 săptămîni la frigider ; 5. Soluție standard stoc. a) Se aduce 1 ml etanol absolut la 100 ml cu apă bidistilată (1 ml alcool absolut = 0,79 g alcool, 1 ml soluție standard stoc = 7,9 mg etanol). b) Deoarece alcoolul absolut absoarbe apa cu ușurință, este preferabil să se folosească alcool de 95° (dintr-o sticlă proaspăt deschisă), 1 ml alcool

Scanned with OKEN Scanner

de 95° se aduce la 100 ml cu apă bidistilată (1 ml soluție standard stoc = 7,5 ml etanol). Dacă se folosește ultima variantă pentru prepararea standardului stoc, se ține seama la calcule de factorul 7,5/7,9 = 0,95 ; 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1 : 10. În raport cu standardul utilizat, a) sau b), 1 ml standard de lucru = = 0,79 mg sau 0,75 mg etanol.

Modul de lucru

Într-o eprubetă de centrifugă se introduc 4 ml soluție deproteinizantă și 0,5 ml sînge total sau ser, se omogenizează cu o baghetă de sticlă, se închide eprubeta cu un dop de cauciuc și se centrifughează 5 minute la 3 000 rot./minut.

Într-o eprubetă se introduc 4,8 ml soluție tampon și 0,1 ml soluție NAD. Se omogenizează și se adaugă 0,1 ml supernatant de la sîngele (serul) deproteinizat. Se omogenizează și se adaugă 0,02 ml soluție ADH. Se omogenizează și se închide cu dopul, lăsîndu-se în repaus 70 minute la 25°C sau 25 minute la 37°C.

În mod similar se prepară un blanc al reactivilor, înlocuind 0,1 ml supernatant cu 0,1 ml soluție deproteinizantă.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 340$ nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu blancul. Extincția blancului, măsurată față de apă bidistilată, nu trebuie să depășească valoarea de 0,1.

Curba de etalonare se prepară după următoarea schemă :

Balonul/reactivii	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Soluție standard de lucru (ml)	1,01	1,26	1,89	2,53	3,16	3,80
Apă bidistilată (ml)	ad 100					
Concentrația, mg/ml	0,8	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

În continuare se lucrează ca pentru probe luînd cîte 0,1 ml din fiecare diluție (în loc de 0,1 ml supernatant), se măsoară extincțiile și se trasează curba etalon.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a etanolului, în g/ml.

Calcul

Rezultatele se exprimă în g etanol/litru sînge :

$$\text{g etanol/litru sînge} = C \cdot 1\,000$$

Observații

1. Pentru prepararea reactivilor, se pot folosi seturi de amestecuri, livrate de diferite firme (Merck, Boehringer, Serva etc.). 2. Dacă determinările se fac în serie, se folosește un singur blanc. 3. Toată sticlăria trebuie perfect curățată. Se evită orice urmă de etanol sau acetaldehidă din atmosfera laboratorului. Se recomandă folosirea acelorași pipete pentru același

Scanned with OKEN Scanner

reactiv, pentru anularea eventualelor erori de calibrare. 4. Se poate utiliza, în loc de scară standard, o singură diluție etalon pentru fiecare serie de determinări, calculînd după următoarea relație :

$$\text{g etanol/litru sînge} = \frac{\text{Ext. probă}}{\text{Ext. standard}} \cdot \text{conc. sol. standard} \cdot 1000$$

Interpretarea rezultatelor

În raport cu alcoolemia, în intoxicația acută, se disting următoarele trei faze :

— faza denumită „de excitație (alcoolemia 0,5—1,5 g‰), cu euforie, logoree, expansivitate, senzație de căldură (vasodilatație periferică), diminuarea capacităților fizice și psihice ;

— faza medico-legală (faza de „beție", alcoolemie 1,5—2,5 g‰) cu mers ebrios, dizartrie, confuzie mintală, scăderea accentuată a acuității auditive și vizuale, tulburări psihice (acte agresive) ;

— faza comatoasă (alcoolemie peste 2,5 g‰) ; midriază, hipotermie, comă, uneori cu sfîrșit letal.

Alcoolemiile peste 4 g‰ conduc rapid la comă și moarte.

II.4.4. FENOLUL

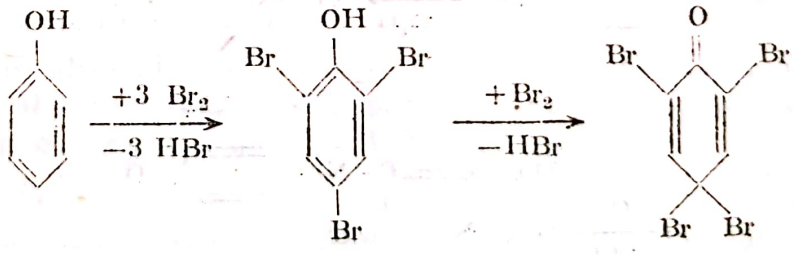
A. Izolare

Fenolul se izolează din aer prin reținere în soluții alcaline, iar din produse biologice, prin distilare sau antrenare cu vapori de apă, după ce în prealabil s-a executat o hidroliză acidă, pentru a elibera fenolul din sulfo- și glucurono-conjugați.

B. Identificare

1. *Decelarea mirosului :* fenolul are un miros caracteristic și extrem de pătrunzător. Sensibilitate : 1/28 000.

2. *Reacția cu apă de brom :* se tratează 2 ml soluție de analizat cu cîteva picături apă de brom, cînd apare un precipitat alb de tribromfenol, care în exces de reactiv trece în p. cetotetrabrombenzen :



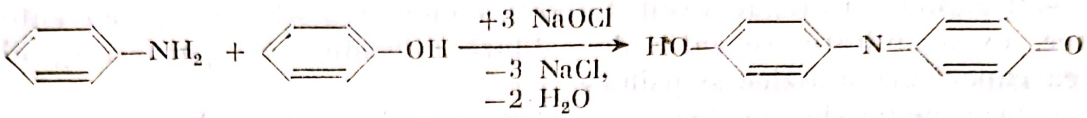
Compusul ceto poate fi readus la tribromfenol prin trecerea unui curent de SO_2. Sensibilitate : 1/100 000.

3. *Reacția cu clorură ferică :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă cîteva picături de $FeCl_3$ soluție 1%, proaspăt preparată, cînd se dezvoltă o colorație a bastră-violetă, prin formarea $C_6H_5OFe^{2+}$. Reacția este împiedicată de prezența etanolului, glicerolului și a HCl (acesta apare, prin hidroliză, în soluțiile vechi de $FeCl_3$). Sensibilitatea reacției : 1/1 000.

Scanned with OKEN Scanner

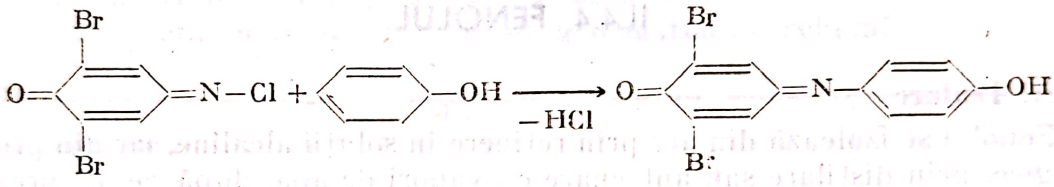
Reacția este dată de toți fenolii, cu excepția hidrochinonei (care trece în chinonă). Diferențierea fenolului de acidul salicilic, care dă această reacție, se face astfel : soluția de analizat este alcalinizată cu carbonat acid de sodiu, cînd se formează salicilat de sodiu, se agită cu eter, care extrage numai fenolul, identificat în continuare prin reacția cu $FeCl_3$.

4. *Reacția Jacquemin :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă cîteva picături de anilină, 1% și 0,5 ml hipoclorit de Na 10%, cînd apare o coloratie albastră, prin formarea indofenolului, care virează la roșu prin acidulare și revine la albastru prin alcalinizare.



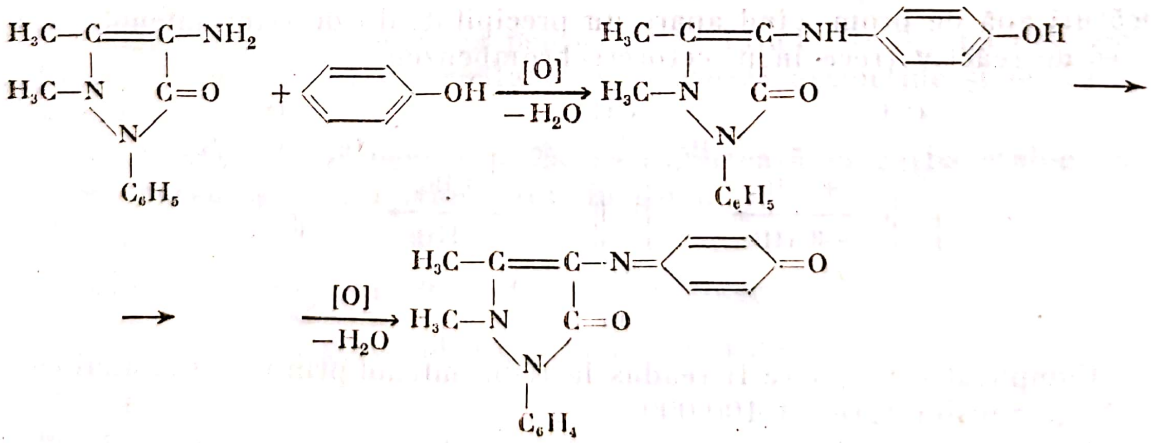
În absența fenolului apare o coloratie violetă-purpurie, prin formarea moveinei din oxidarea anilinei. Reacția este comună și altor fenoli. Sensibilitate : 1/100 000.

5. *Reacția Gibbs :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 2 ml tampon fosfat *p*H 10 și 1 ml reactiv Gibbs (2,6-dibrom-chinon-4-clorimidă 1% în alcool etilic absolut), cînd se dezvoltă o culoare albastră, prin formarea 2,6-dibrom-chinon-4-iminofenolului :



Reacția servește la identificarea cantităților mici de fenoli și se aplică tuturor fenolilor nesubstituiți în poziția para.

6. *Reacția Rosenblatt :* se alcalinizează 2 ml soluție de analizat cu Na_2CO_3 10% și se tratează cu 1 ml 4-aminoantipirină 2% și 0,5 ml fericianură de potasiu 5%, cînd apare o coloratie roșie, prin formarea unui compus chinoniminic :



Reacția este dată de toți fenolii care au poziția para față de oxidrilul fenolic, liberă sau substituită cu halogeni, hidroxil, metoxil, carboxil, grupare sulfonică, iar oxidrilul fenolic liber. Se obțin coloratii diferite, în raport cu natura și numărul substituenților din ciclul benzenic.

Scanned with OKEN Scanner

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Fenolul reduce acidul fosfopolimolibdenic (reactivul Folin-Ciocîlteu), la albastru de molibden, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 0,2 μg fenol/ml. Metoda este specifică.

Reactivi

1. Soluția absorbantă : hidroxid de sodiu 0,1 N. 2. Acid clorhidric 0,1 N. 3. Acid clorhidric 1 N. 4. Carbonat de sodiu 20%. 5. Reactiv Folin-Ciocîlteu. Într-un balon de 500 ml prevăzut cu refrigerent ascendent cu reflux, se dizolvă în 350 ml apă, 50 g wolframat de sodiu, $Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$, p.a. și 12,5 g molibdat de sodiu, Na_2MoO_4, p.a. Se adaugă 25 ml acid fosforic 85%, p.a. și 50 ml HCl concentrat (d = 1,19). Se montează refrigerentul ascendent la balon și se fierbe la reflux timp de 10 ore. Se deconectează refrigerentul, se adaugă 75 g sulfat de litiu, Li_2SO_4, p.a., 25 ml apă, 10 picături de brom și se continuă fierberea (deschis, fără refrigerent), timp de 15 minute, pentru a se elimina excesul de brom. Se lasă să se răcească și se completează cu apă distilată la 500 ml. Soluția obținută se filtrează. Culoarea reactivului trebuie să fie galbenă-aurie. Se conservă în sticle brune, bine închise, timp de mai multe luni. Dacă, în timp, soluția capătă o tentă verzuie, se tratează din nou cu brom. La întrebuințare, soluția astfel preparată se diluează cu un volum egal de apă distilată. 6. Soluție standard stoc. Se dizolvă, într-un balon cotat de 1 000 ml, 1,2 g fenol pur cristalizat în HCl 0,1 N. Se determină conținutul exact în fenol, astfel : într-un vas conic cu dop rodat, se iau 10 ml din soluția de fenol de mai sus și se adaugă 20 ml NaOH 0,1 N. Se încălzește pe baia de apă pînă la temperatura de 65°C, cînd se adaugă repede 20 ml soluție de iod 0,1 N. Se închide balonul și se titrează excesul de iod cu tiosulfat de sodiu 0,1 N, folosind ca indicator soluție de amidon (1 ml soluție de iod 0,1 N este consumat de 1,567 mg fenol). 7. Soluție standard stoc. Se diluează un alicot din soluția standard stoc, pentru a obține o soluție cu 1 ml = 10 μg fenol. Soluția se prepară extemporaneu.

Recoltarea probelor

Se aspiră 1 litru aer cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul absorbitorului într-o eprubetă gradată de 20 ml. Se neutralizează, la început cu HCl 1 N, apoi, aproape de punctul de neutralitate, cu HCl 0,1 N în prezența hîrtiei de turnesol și se completează cu apă la 20 ml. Se iau 10 ml soluție, se adaugă 0,5 ml reactiv Folin-Ciocîlteu și 2 ml carbonat de sodiu 20%. Se agită și după 30 minute, se introduce *exact* timp de 1 minut într-o baie de apă adusă la fierbere. Se răcește imediat la jet de apă.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Scanned with OKEN Scanner

Se măsoară extincția probei după 5—10 minute la spectrofotometru la $\lambda = 720$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg fenol, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă) obținîndu-se concentrația C a fenolului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg fenol/m^3 aer :

$$\text{mg fenol/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația fenolului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

D. **Dozare în urină**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru fenoli totali*

Principiu

Principiul este același ca la dozarea în aer.

Reactivi

1. Carbonat acid de sodiu soluție saturată. 2. Carbonat de sodiu 20%. 3. Acid sulfuric 1 : 1, v/v (din acid sulfuric d = 1,84). 4. Reactiv Folin-Ciocîlteu (v. Dozare din aer). 5. Soluție standard de lucru (v. Dozare din aer).

Recoltarea probelor

Se recoltează urina înainte și după expunere la toxic.

Modul de lucru

Distilarea : a) *Fenoli liberi :* într-un balon de distilare se iau 5 ml urină, 75 ml apă și 2 ml carbonat acid de sodiu. Se distilă la flacără mică, culegîndu-se 25 ml. b) *Fenoli conjugați :* se lasă balonul să se răcească și se adaugă 2 ml H_2SO_4 1 : 1. Se continuă distilarea, culegîndu-se 50 ml.

Determinarea : într-o eprubetă se iau 5 ml distilat conținînd fenoli liberi, iar în altă eprubetă, 5 ml distilat conținînd fenoli conjugați. În fiecare eprubetă se adaugă 0,25 ml reactiv Folin-Ciocîlteu și 1 ml carbonat de sodiu 20%. Se agită și se introduc eprubetele într-o baie de apă la fierbere, unde se mențin *exact* 1 minut, apoi se răcesc imediat la curent de apă.

În paralel cu probele, se prelucrează și o probă de 5 ml apă, care constituie blancul reactivilor.

Se măsoară extincția probelor după 5—10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 720$ nm, în cuva de 1 cm, față de blancul reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 25 μg fenol, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrațiile C_1 (pentru fenolul liber) și C_2 (pentru fenolul conjugat), în μg.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/fenoli/litru urină :

mg fenoli liberi/litru urină = C_1

mg fenoli conjugați/litru urină = $C_2 \cdot 2$ (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din distilat, reprezentînd fenolii din 0,5 ml urină)

mg fenoli totali/litru urină = mg fenoli liberi + mg fenoli conjugați.

Interpretarea rezultatelor

Fenolul pătruns în organism este, în majoritate, oxidat și conjugat cu sulfatul și acidul glucuronic. De asemenea benzenul este oxidat în organism la fenol, iar acesta oxidat și conjugat. Fenolul urinar reprezintă un indicator mai sensibil decît sulfat-indexul pentru expunerea la fenol și la benzen.

Persoanele neexpuse elimină în mod normal prin urină pînă la 4 mg/24 ore fenoli liberi și 10—16 mg/24 ore fenoli totali. După administrare de salicilați, fenolii urinari cresc.

II.4.5. ALDEHIDELE

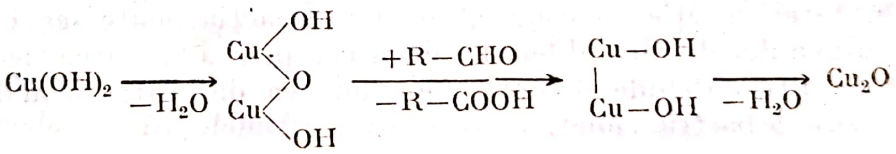
A. Izolare

Aldehidele se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice, prin distilare și antrenare cu vapori de apă.

B. Identificare

1. *Reacții comune aldehidelor*

a. *Reacția Fehling :* peste 2 ml soluție de analizat se adaugă 2 ml reactiv Fehling și se aduce la fierbere, cînd apare un precipitat roșu-cărămiziu de Cu_2O :



Reactivul Fehling se prepară amestecînd, la întrebuințare, părți egale din soluția A și B. Soluția A : se dizolvă 35 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ în apă, se adaugă 5 ml H_2SO_4 conc. și se completează cu apă la 1 000 ml. Soluția B : se dizolvă 150 g sare Seignette (tartrat de K și Na) în apă, se adaugă 300 ml NaOH 30% și se completează cu apă la 1 000 ml.

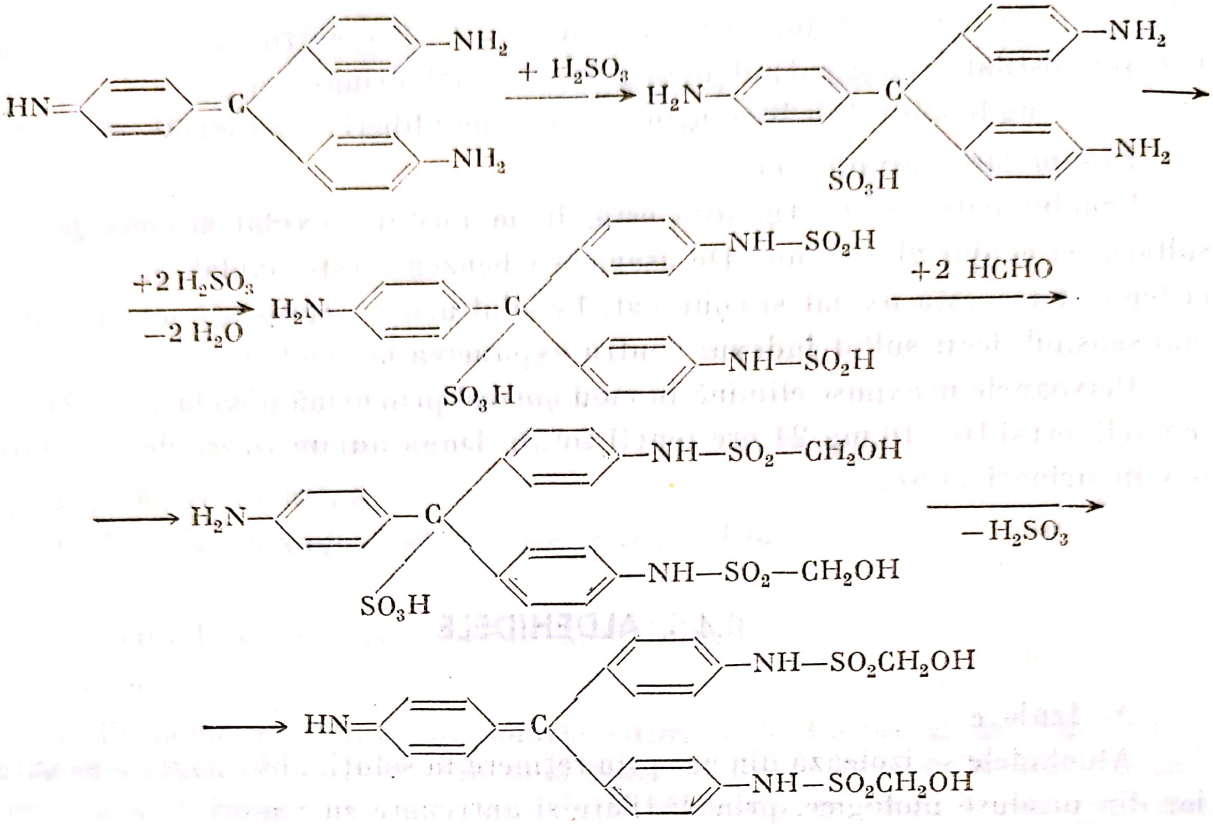
b. *Reacția Nessler :* peste 2 ml soluție de analizat se adaugă 2—3 picături de reactiv Nessler, cînd apare un precipitat negru, prin punerea în libertate a mercurului metalic :

$$K_2[HgI_4] + 3\ KOH + HCHO \rightarrow Hg + HCOOK + 4\ KI + 2\ H_2O$$

Pentru prepararea reactivului Nessler v. Amoniacul.

Scanned with OKEN Scanner

c. *Reacția Schiff :* peste 1 ml soluție de analizat se adaugă cîteva picături reactiv Schiff, cînd apare o coloroație roșie-violetă, datorată unui derivat trifenilmetanic :



Reactivul Schiff se prepară astfel : se dizolvă 0,2 g fuxină bazică (pararozanilină) în 120 ml apă fierbinte, se răcește, se adaugă 20 ml soluție de bisulfit de sodiu 10 (bisulfitul nu trebuie să fie oxidat) și 2 ml HCl conc., apoi se completează la 200 ml cu apă. Se întrebuințează după minimum 2 ore. Reactivul trebuie să fie incolor, el se colorează sub acțiunea oxidanților sau prin încălzire.

Sensibilitatea reacției este de 0,2 μg/ml. Reacția poate servi la diferențierea formaldehidei de alte aldehide, deoarece prin adăugarea de HCl, coloraţia dată de alte aldehide dispare, pe cînd cea datorată formaldehidei se intensifică spre albastru-violet.

d. *Reacția Marquis :* se tratează 5 părți soluție de analizat cu o parte H_2SO_4 conc. și se răcește. La 3—5 picături din această soluție se adaugă 2—3 cristale de codeină sau morfină dizolvate în 2 ml H_2SO_4 conc., cînd apare o coloraţie violet-roșie pînă la violet-albastră.

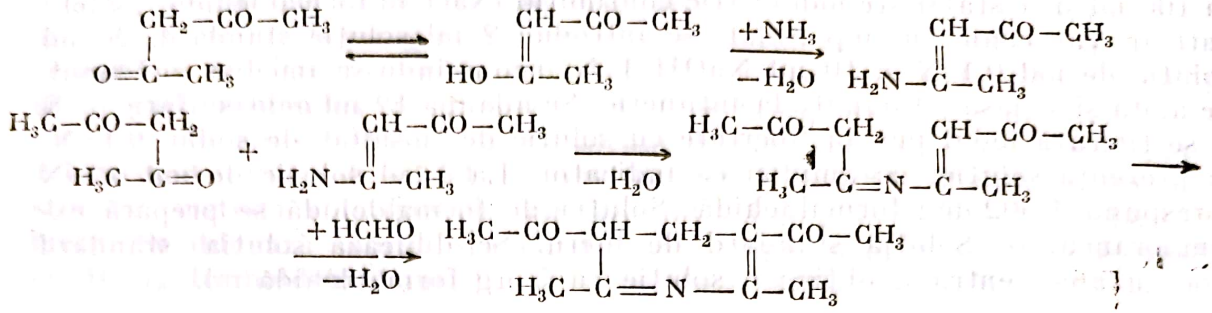
e. *Reacția Eegrive (cu acid cromotropic) :* se tratează 1 ml soluție de analizat cu 1 ml reactiv cromotropic, cînd apare o coloraţie violetă.

Reactiv acid cromotropic : se dizolvă 0,2 g acid cromotropic în 2 ml apă și se aduce la 100 ml cu acid sulfuric concentrat.

f. *Reacția Scheyver* (cu fenilhidrazină) : la 1 ml soluție de analizat se adugă 1 ml soluție 1% de fenilhidrazină clorhidrică, proaspăt preparată, 1 ml acid clorhidric d = 1,19 și 1 ml fericianură de potasiu 1%, cînd apare o coloraţie roșie.

2. *Reacții specifice formaldehidei*

a. *Reacția cu acetilacetonă :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă 2 ml reactiv acetilacetonă și se menține 5 minute în baia de apă la fierbere, cînd se dezvoltă o colorație galbenă, datorată diacetildihidrolutidinei :



Reactiv acetilacetonă : se dizolvă în apă 25 g acetat de amoniu, se adaugă 2 ml acid acetic glacial, 0,2 ml acetilacetonă și se aduce la 100 ml cu apă.

Metoda este specifică. Sensibilitate : 0,2 μg/ml.

3. *Reacții de diferențiere a formaldehidei de alte aldehide*

a. *Reacția cu nitroprusiat de sodiu :* la tratarea soluției de analizat cu 1 ml nitroprusiat de sodiu 1% se formează o colorație albastră în prezența formaldehidei și roșie în prezența acetaldehidei.

b. *Reacția cu tetrahidrostricnină :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă cîteva picături de reactiv tetrahidrostricnină : în prezența formaldehidei se observă o colorație albastră, iar în prezența aldehidelor aromatice (de tip benzaldehidă) o colorație verde.

Reactiv tetrahidrostricnină : se dizolvă cîteva cristale de stricnină în 2 ml HCl d = 1,19 și se adaugă zinc pulbere un vîrf de spatulă sau 1—2 granule de amalgam de zinc. Se încălzește 5—10 minute, se transvazează și se utilizează lichidul limpede.

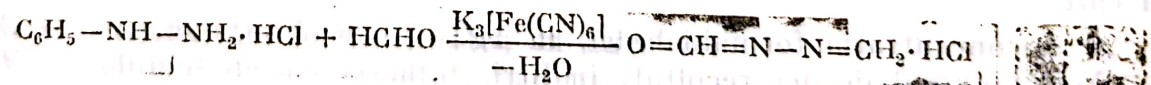
c. *Reacția van Eck :* la tratarea soluției de analizat cu benzidină soluție 1% în acid acetic se formează, în prezența formaldehidei, o colorație galben-portocalie, care prin încălzire trece la roșu deschis. În aceleași condiții benzaldehida dă o colorație gălbuie, apoi un precipitat galben.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică cu fenilhidrazină pentru formaldehidă*

Principiu

Formaldehida se condensează cu fenilhidrazina, trecînd în fenilhidrazonă, care cu fericianura de potasiu în mediu acid dă un compus chinoniminic, roșu colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de alte aldehide și alți reducători.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : apă distilată. 2. Fenilhidrazină clorhidrică, soluție 1%. Se dizolvă 1 g fenilhidrazină clorhidrică în 2 ml HCl d = 1,19 și

se aduce la 100 ml cu apă. Se agită energic și la nevoie, se filtrează prin vată de sticlă. Se prepară extemporaneu. 3. Acid clorhidric, soluție 0,1 N. 4. Fericianură de potaiu, soluție 2%. Se prepară extemporaneu. 5. Soluție standard stoc. Se diluează 0,5 ml soluție de formaldehidă 40%, cu apă, la 100 ml și se stabilește iodometric conținutul exact în formaldehidă, astfel: într-un vas conic cu dop rodat, se introduc 2 ml soluție standard, 20 ml soluție de iod 0,1 N și 10 ml NaOH 1 N, acoperindu-se imediat cu dopul. Se agită și se lasă 10 minute la întuneric. Se adaugă 12 ml acid sulfuric 1 N și se titrează iodul pus în libertate cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 N, în prezența soluției de amidon ca indicator. La 1 ml soluție de iod 0,1 N corespund 1,502 mg formaldehidă. Soluția de formaldehidă se prepară extemporaneu. 6. Soluția standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă pentru a obține o soluție cu 5 μg formaldehidă/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 10 litri aer cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml apă distilată.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două absorbitoare cu cîte 10 ml apă distilată, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul fiecărui absorbitor cantitativ, în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se, eventual, la 10 ml. Se iau 5 ml soluție absorbantă, se adaugă 5 ml fenilhidrazină și se lasă în repaus 4 minute, apoi se adaugă 1 ml HCl 0,1 N și 0,5 ml fericianură, agitîndu-se.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția după 15—30 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 25 μg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a formaldehidei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg formaldehidă/m³ aer:

$$\text{mg formaldehidă/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația formaldehidei, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. Metoda spectrofotometrică cu acid cromotropic, pentru formaldehidă

Principiu

Formaldehida formează cu acidul cromotropic (acid 1,8-dihidroxinaftalen-3,6-disulfonic), în mediu acid, un compus violet colorimetrabil (v. Metanolul).

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea metodei este de 0,2 μg/ml. Reacția este specifică. Poate interfera acroleina însă, condițiile metodei, interferența este înlăturată.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : acid cromotropic, soluție 1% în acid sulfuric d = 1,84. Se dizolvă 1 g acid cromotropic în 100 ml acid sulfuric d = 1,84, se agită și se filtrează repede printr-o pîlnie filtrantă în vid. Soluția trebuie să fie galbenă-deschis. Se păstrează în sticle brune. Dacă acidul cromotropic nu este pur, se recristalizează din alcool. La întrebuințare, se face o diluție 1:1 cu acid sulfuric d = 1,84 ; 2. Acid sulfuric d = 1,84 ; 3. Soluție standard stoc (v. metoda colorimetrică cu fenilhidrazină) ; 4. Soluția standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, pentru a obține o soluție cu 10 μg formaldehidă/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 0,2 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 2 ml soluție absorbantă, pînă cînd lichidul din microabsorbitor se colorează în violaceu.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitorului într-un balon cotat de 25 ml, reluînd de două ori cu cîte 2 ml acid sulfuric concentrat. Se completează cu acid sulfuric concentrat, d = 1,84, pînă la 11 ml și se adaugă 2 ml apă agitînd. Se lasă 15 minute în repaus. Se completează cu apă la 25 ml, agitînd ușor și răcind sub jet de apă.

În paralel se prelucrează și probele martor.

După 10 minute se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 580$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 20 μg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus, însă fără a adăuga 2 ml apă înainte de repausul de 15 minute. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a formaldehidei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg formaldehidă/m³ aer :

$$\text{mg formaldehidă/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația formaldehidei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda spectrofotometrică pentru acroleină*

Principiu

Acroleina, $CH_2=CH-CH=O$, reacționează cu 4-hexilrezorcina în soluție alcoolică, cu adaos de acid tricloracetic și în prezența clorurii mercurice formînd un complex albastru-violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 0,4 μg/ml. Reacția este specifică.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi

1. Soluția alcoolică de 4-hexilrezorcină. Se dizolvă 5 g 4-hexilrezorcină în 10 ml alcool etilic de 95°. 2. Soluție saturată de acid tricloracetic. La 100 g acid tricloracetic se adaugă 10 ml apă distilată și se încălzește pînă la dizolvare, apoi se completează cu apă distilată la 70 ml. 3. Soluție alcoolică de clorură mercurică 3%. Se dizolvă 3 g clorură mercurică în 100 ml alcool etilic de 95°. 4. Soluție absorbantă. La 1 ml soluție alcoolică de 4-hexilrezorcină se adaugă 2 ml soluție alcoolică de $HgCl_2$, 50 ml soluție de acid tricloracetic și se completează la 100 ml cu alcool etilic de 95°. Reactivul se prepară extemporaneu. 5. Soluție standard stoc. Se cîntărește exact un balon cotat de 25 ml, care conține aproximativ 10 ml alcool etilic. Se adaugă 2—3 picături de acroleină (avînd grijă să nu se prelingă pe pereți) și se recîntărește, diferența reprezentînd greutatea acroleinei. Se completează balonul cu etanol și se calculează conținutul în acroleină pe 1 ml. 6. Soluție standard de lucru. Se dilucază cu alcool de 95° un alicot din soluția standard stoc, pentru a obține o soluție cu 10 μg acroleină/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 10 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă. În timpul recoltării, absorbitoarele sînt menținute îutr-un vas cu apă rece și ferite de căldură.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul fiecărui absorbitor în cîte o eprubetă gradată, completîndu-se la 10 ml cu soluție absorbantă. Se introduc eprubetele timp de 10 minute într-o baie de apă încălzită la 60°C, se răcesc sub jet de apă.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 605$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 20 μg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2, în μg, a acroleinei din cele două absorbitoare.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acroleină/m^3 aer :

$$\text{mg acroleină/m}^3\text{/aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C_1, C_2 = concentrația acroleinei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Probele recoltate se prelucrează în aceeași zi ; pot fi păstrate la frigider sau la întuneric pînă în ziua următoare. 2. La prepararea soluției standard stoc, se folosește acroleină proaspăt distilată.

Scanned with OKEN Scanner

II.4.6. ACETONA

A. Izolare

Acetona se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice, prin distilare, antrenare cu vapori de apă și — din urină și sînge — prin microdifuzie în celule Conway sau Mezincescu.

B. Identificare

1. *Reacția Lieben :* se procedează ca la alcoolul etilic. Reacția este următoarea :

$$H_3C-CO-CH_3 + 3\,I_2 + 4\,NaOH = CHI_3 + CH_3-COONa + 3\,NaI + 3\,H_2O$$

Reacția este pozitivă și pentru etanol, dar este împiedicată de amoniac (v. Etanol).

2. *Reacția Imbert-Bonneamour (reacția Legal modificată) :* la 2 ml soluție de analizat, se adaugă 8—10 picături de reactiv Imbert, se agită și se suprapune 1 ml amoniac cînd apare, la zona de contact a lichidelor, un inel violet ; prin formarea acetonizonitrozopentacianoferatului :

$$H_3C-CO-CH_3 + Fe(CN)_5NO^{2-} + 2\,OH^- = Fe(CN)_5NO=CH-CO-CH_3$$

Reactiv Imbert : la 100 ml nitroprusiat de sodiu 10% se adaugă 10 ml acid acetic glacial.

3. *Reacția Frommer :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 10 picături de aldehidă salicilică soluție 10% ; inițial apare o colorație verzuie, care trece în galben-portocaliu, iar prin încălzire la 60°, în portocaliu-roșu, prin formarea di-hidroxibenzilidenacetonei.

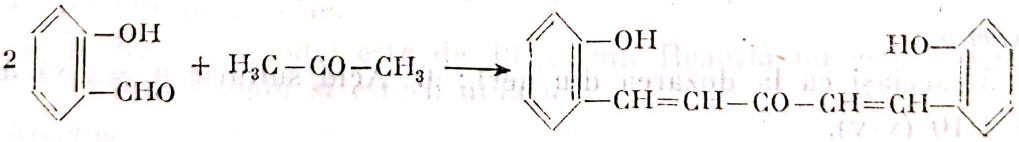
4. *Reacția cu furfurol :* la 2 ml soluție de analizat alcalinizată cu NaOH 10% se adaugă cîteva picături de furfurol : se formează di-furfurilidenacetona, care cu acidul sulfuric dă o colorație violetă.

C. Dozarea din aer

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Acetona reacționează cu aldehida salicilică în mediu alcalin cu formare de di-hidroxibenziliden-acetonă galben-portocalie, colorimetrabilă :



Sensibilitatea metodei este de 1,6 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de toate cetonele alifatice.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : bisulfit de sodiu 0,5% (preparată extemporaneu) sau apă distilată. 2. Hidroxid de potasiu 63%. 3. Aldehidă salicilică p.a. soluție 10% în alcool etilic 95° (v/v). Se prepară extemporaneu. 4. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 1—2 picături de acetonă în bisulfit de sodiu 0,5%, astfel ca să se obțină o soluție de aproximativ 1 mg/ml. 5. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă, pentru a obține o soluție cu 5 μg acetonă/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 1 litru aer, cu un debit de 0,15 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 2 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește prin transvazare conținutul microabsorbitoarelor într-o eprubetă gradată, spălîndu-se cu soluție absorbantă pînă la 15 ml. Se iau 3 ml soluție (deci 1/5 din probă), se adaugă 2 ml KOH 63% și 1 ml soluție de aldehidă salicilică. Se agită și se menține 20 minute într-o baie de apă la 50°C (±2°), apoi se răcește.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 470$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 5 (pentru că s-a lucrat cu 1/5 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C a acetonei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acetonă/m³ aer :

$$\text{mg acetonă/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația acetonei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

D. Dozare din sînge și urină

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Metoda se bazează pe același principiu ca la dozarea din aer.

Reactivi

1—5 (aceiași ca la dozarea din aer) ; 6. Acid sulfuric d = 1,84 diluat cu apă 1:10 (v/v).

Recoltarea probelor

Se recoltează probe de sînge și urină în timpul lucrului sau la scurt timp după expunere.

Modul de lucru

În compartimentul central al unei celule Conway (v. Oxidul de carbon) se ia 1 ml bisulfit de sodiu iar în cel periferic se introduc în ordine : 1 ml sînge sau urină, 5 ml apă și 1 ml acid sulfuric. Se mențin celulele 60 minute la etuvă la 60°C.

Se trece cantitativ conținutul compartimentului central într-o eprubetă gradată, reluînd cu porțiuni mici de bisulfit de sodiu pînă la 6 ml. Se pipetează într-o eprubetă 3 ml din această soluție (deci 1/2 din probă), 2 ml KOH și 1 ml aldehidă salicilică și se prelucrează mai departe ca la dozarea din aer. Citirea extincțiilor probelor se face față de un blanc al reactivilor. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din probă), obținîndu-se concentrația C a acetonei, în μg, în 1 ml sînge sau urină.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acetonă/100 ml sînge și mg acetonă/urina din 24 ore :

$$\text{mg acetonă/100 ml sînge} = \frac{C}{1\,000} \cdot 100 = \frac{C}{10}$$

$$\text{mg acetonă volum urinar din 24 ore} = \frac{C}{1\,000} \cdot V_{24}$$

în care :

C = concentrația acetonei în sînge (urină) în μg ;
V_{24} = volumul urinar din 24 ore, în ml.

II.4.7. ETERUL ETILIC

A. **Izolare**

Eterul etilic se izolează din aer prin reținere într-o soluție oxidantă, iar din produse biologice, prin distilare.

B. **Identificare**

1. *Reducerea dicromatului* : (v. Etanolul)

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Eterul etilic este oxidat cu o soluție acidă de dicromat de potasiu. Se apreciază fotometric dicromatul de potasiu consumat în această oxidare, în raport cu o cantitate cunoscută luată în lucru, deducîndu-se cantitatea de eter intrată în reacție.

Sensibilitatea metodei este de 40 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferă alcoolii și esterii alifatici.

Reactivi

Dicromat de potasiu : se dizolvă 1,3233 g dicromat de potasiu p.a. în 100 ml apă distilată, se adaugă, răcind sub robinet, 140 ml acid sulfuric d = 1,84 ; după răcire, se completează la 250 ml cu apă (1 ml oxidează 1 mg eter etilic).

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 0,150 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 2 ml soluție de dicromat de potasiu. Recoltarea se oprește îndată ce soluția de dicromat își modifică intensitatea culorii, înainte de a deveni verde.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 2 ml soluție de dicromat, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește prin transvazare conținutul microabsorbitoarelor într-un balon cotat de 25 ml, reluînd cu apă pînă la semn.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 430$ nm, în cuva de 1 cm, față de apă, obținîndu-se extincția EP. În același mod se obține din proba martor extincția EM. Se calculează concentrația C a eterului, în mg, din probă :

$$C = \frac{EM - EP}{EM} \cdot n$$

în care : n = numărul de ml soluție de dicromat conținut în cele două microabsorbitoare, care corespund la un număr egal de mg eter.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg eter etilic/m³ aer :

$$\text{mg eter etilic/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

în care :

C = concentrația eterului, în mg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Recoltarea probelor de aer se face cu aspiratoare hidrostatice de 1 litru, gradate din 50 în 50 ml, pentru a putea măsura exact volumul de aer în momentul schimbării intensității culorii soluției de dicromat.

II.4.8. ESTERII

A. **Izolare**

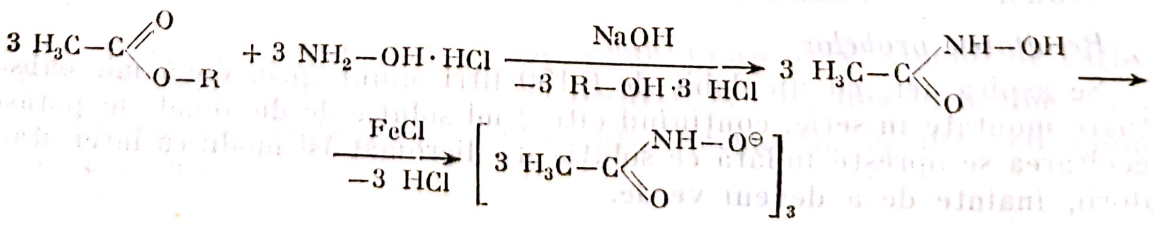
Esterii se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice prin distilare.

B. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru esterii acidului acetic*

Principiu

Acetații de metil, etil, butil și izoamil reacționează cu hidroxilamina în mediu alcalin, dînd acid acetohidroxamic, care cu clorura ferică, formează un complex brun-roșu de tip Hantzsch, colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 8 μg/ml. Metoda este specifică pentru acetații de metil, etil, butil și izoamil, însă pot interfera acrilații alifatici, anhidrida ftalică și toate substanțele care dau acid hidroxamic cu hidroxilamina.

Reactivi

1. Soluție absorbantă: alcool etilic pur. Se mențin 2 ore pe baia de apă la 90—100°C și refrigerent cu reflux, 1 000 ml alcool etilic absolut ce conține 100 g hidroxid de potasiu, apoi se distilă alcoolul, îndepărtînd primii și ultimii 100 ml; 2. Hidroxilamină clorhidrică, soluție 20% (soluția se păstrează la rece maximum 2 săptămîni); 3. Hidroxid de sodiu, soluție 20%; 4. Acid clorhidric, soluție 50% (v/v); 5. Clorură ferică, $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$, soluție 12%. Se dizolvă 12 g clorură ferică în 60—70 ml HCl 0,1 N, apoi se completează la 100 ml cu HCl 0,1 N; 6. Soluție standard stoc. Se face o soluție din esterul respectiv, în alcool etilic, prin cîntărire, astfel ca să se obțină o concentrație de aproximativ 5 mg/ml; 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic, pentru a obține o soluție cu 0,2 mg ester/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 10 litri aer, cu un debit de 1 litru/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a recolta aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitorului într-o eprubetă gradată, completînd, eventual, la 10 ml cu soluție absorbantă. Se iau într-un balon cotat de 25 ml, 5 ml soluție și se adaugă 2 ml hidroxilamină și 2 ml hidroxid de sodiu. După minimum 1 minut, se adaugă 2 ml HCl și 5 ml clorură ferică, apoi se completează la semn cu apă.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția, după 30 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuve de 2 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0,2 și 1,0 mg, prin puncte din 0,2 în 0,2, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă), obținîndu-se concentrația C, a esterului, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg ester/m³ aer:

$$\text{mg ester/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V} \cdot 1\,000$$

în care:

C = concentrația esterului, în mg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

Observație

Cînd se presupune că ar exista numai cantități mici de ester în aer, se lucrează cu toată cantitatea de soluție absorbantă, ținînd seama de aceasta la calcul.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru acetatul de vinil*

Principiu

Acetatul de vinil se saponifică cu hidroxid de potasiu, rezultînd alcool vinilic și acid acetic. Alcoolul vinilic trece, în mediu alcalin în aldehidă acetică, iar aceasta reacționează cu acidul fuxinsulfonic, dînd un compus roșu-violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 1 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de toate aldehidele alifatice.

Reactivi

1. Acid fuxinsulfonic. În 500 ml apă fierbinte se dizolvă 0,25 g fluxină bazică, iar după răcire se barbotează dioxid de sulf pînă la decolorarea totală și persistentă a soluției. Se consideră soluția total decolorată cînd o coloană de soluție de 15 cm înălțime este incoloră. Reactivul se păstrează maximum 30 zile. 2. Hidroxid de potasiu, soluție 0,02 N. 3. Acid clorhidric, soluție 0,02 N. 4. Fenolftaleină, soluție alcoolică 0,5%. 5. Soluție standard stoc. Se cîntărește exact un balon cotat de 25 ml care conține aproximativ 10 ml apă, se adaugă cîteva picături de acetat de vinil (din produsul folosit la locul de muncă) și se recîntărește ; diferența dintre cîntăriri reprezintă greutatea acetatului de vinil. Se completează la semn cu apă și se calculează conținutul de acetat de vinil pe ml. 6. Soluție standard de lucru. Se diluează cu apă soluția standard stoc, pentru a obține o soluție cu 50 μg acetat de vinil/ml.

Recoltarea probelor

Aerul se recoltează în flacoane de 1—2 litri, exact calibrate prin dislocuire de apă. Vasele bine închise se transportă în laborator.

Modul de lucru

Vasul cu proba recoltată se răcește sub un curent de apă pentru a se contracta volumul gazului. Se introduc 10 ml apă distilată, se rotește vasul pentru a repartiza lichidul în strat subțire pe pereții vasului, apoi se lasă în repaus 2—3 ore. Se adaugă în vas 2,5 ml soluție KOH 0,02 N, se agită și se lasă în repaus 30 minute. Se introduc 2—3 picături soluție de fenolftaleină și se titrează cu HCl 0,02 N pînă la reacție neutră. Se aduce soluția din vas într-o eprubetă gradată și se completează cu apă distilată la 15 ml, apoi se adaugă 0,5 ml acid fuxinsulfonic și se agită.

În paralel se prelucrează o probă martor cu 10 ml apă.

Se măsoară extincția după 40 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 550$ nm, în cuvă de 2 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 100 μg, prin puncte din 20 în 20 în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C, a acetatului de vinil, în μg, în probă.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acetat de vinil/m³ aer :

$$\text{mg acetat de vinil/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația acetatului de vinil, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda spectrofotometrică pentru metacrilatul de etil*

Principiu

Radicalul vinil din metacrilatul de etil, $CH_2=C(CH_3)-COOC_2H_5$, trece în glicol, care se oxidează la formaldehidă cu acid periodic. Formaldehida se condensează cu fenilhidrazină dînd fenilhidrazonă, care prin oxidare cu fericianură de potasiu, formează un compus chinoniminic, roz-roșu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 4 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind dată de metacrilați, acidul metacrilic, formaldehidă și alți compuși care posedă radicalul vinilic, $CH_2 = CH-$.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : acid sulfuric, soluție 10%. 2. Acid periodic, soluție 0,2%. 3. Arsenit de sodiu, soluție 0,5 M (6,5%). 4. Fenilhidrazină clorhidrică, soluție 1%. Se dizolvă 1 g clorhidrat de fenilhidrazină în 90 ml apă distilată și se adaugă 2 ml HCl d = 1,19. Dacă soluția nu este limpede, se filtrează, apoi se completează la 100 ml cu apă. Se prepară extemporaneu. 5. Fericianură de potasiu, soluție 2%. Se prepară extemporaneu. 6. Acid clorhidric d = 1,19. 7. Soluție standard stoc. Se prepară, prin cîntărire, o soluție de metacrilat de etil în acid sulfuric 10%, astfel încît să se obțină 100 μg metacrilat de etil la 1 ml. 8. Soluție standard de lucru. Se diluează cu acid sulfuric 10% soluția standard stoc, pentru a se obține o soluție cu 10 μg/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 3—4 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer în ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată, cu dop rodat și se completează volumul la 10 ml cu soluție absorbantă. Se adaugă în fiecare eprubetă cîte 1 ml acid periodic, se acoperă cu dopurile (fixate cu leucoplast) și se introduc într-o baie de apă la fierbere, unde se mențin 20 de minute. Se răcesc eprubetele la temperatura laboratorului și se adaugă cîte 1 ml arsenit, se lasă 5 minute, se adaugă 5 ml fenilhidrazină, se agită și se lasă 10 minute. Se adaugă 0,5 ml fericianură, se lasă 3 minute, se adaugă 1 ml HCl concentrat și se agită.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Scanned with OKEN Scanner

Se măsoară extincția după 5 minute la spectrofotometru, la $\lambda = 520$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 50 μg, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru cele două probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2 ale metacrilatului de etil, în μg, din cele două absorbitoare montate în serie.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg metacrilat de etil/m³ aer :

$$\text{mg metacrilat de etil/m}^3\text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V}$$

în care :

C_1 și C_2 = concentrația metacrilatului de etil, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

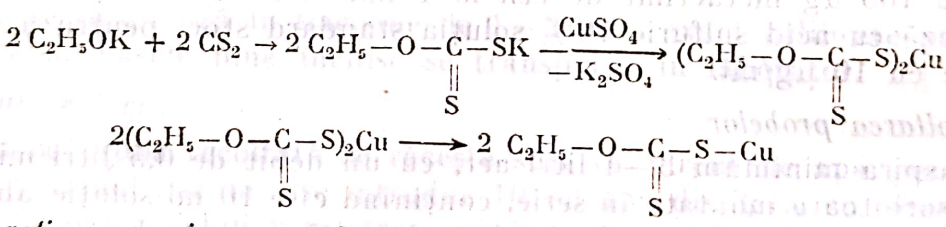
II.4.9. SULFURA DE CARBON

A. Izolare

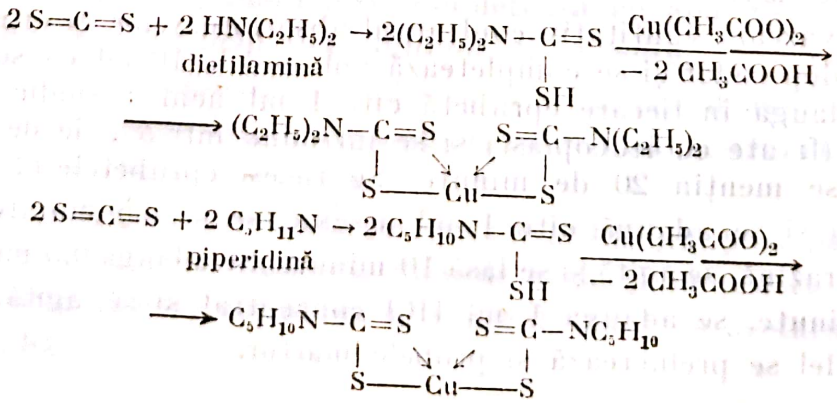
Sulfura de carbon se izolează din aer prin reținere în soluții alcoolice de amine secundare, iar din produse biologice, prin antrenare cu vapori de apă sau de aer.

B. Identificare

1. *Reacția xantogenaților :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml soluție alcoolică de KOH 10%, se încălzește ușor, se acidulează cu acid acetic 1% și se tratează cu 2—5 picături de sulfat de cupru 5% ; se formează întîi un precipitat negru de xantogenat cupric, care trece prin dismutație în xantogenat cupros, galben :



2. *Reacția cu amine secundare (alifatice sau piperidină) :* la 2 ml soluție de analizat se adaugă 2—5 picături de soluție alcoolică de amină secundară 2% și 2—5 picături de acetat de cupru 0,05% cînd apare un precipitat galben de dietilditiocarbamat de cupru :



3. *Reacția cu sulfocianură ferică:* 2 ml soluție de analizat se tratează cu 6 ml alcool saturat cu amoniac și se evaporă pe baia de apă. Se reia reziduul cu 1-2 ml apă distilată, se acidulează cu HCl diluat și se adaugă cîteva picături de $FeCl_3$ 2% cînd apare colorația roșie-sînge de $Fe(SCN)_3$ (dacă, înainte de adăugarea $FeCl_3$, soluția de analizat nu a fost limpede, se filtrează, pentru a îndepărta sulful depus din descompunerea H_2S, apoi se adaugă $FeCl_3$):

$$S{=}C{=}S + NH_3 \rightarrow S{=}C(NH_2){-}SH \rightarrow HS{-}C(=NH){-}SH{-}N{\equiv}C{-}SH + H_2S$$

$$3\ N{\equiv}C{-}SH \xrightarrow{3\ NH_3} 3\ N{\equiv}C{-}S{-}NH_4 \xrightarrow{FeCl_3} Fe(SCN)_3 + 3\ NH_4Cl$$

C. Dozare din aer

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Sulfura de carbon reacționează cu aminele secundare în soluție alcoolică și în prezența sărurilor de cupru, cu formare de dietilditiocarbamat de cupru, galben-brun, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 1 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece interferă hidrogenul sulfurat și acidul tioacetic, dacă se găsesc în aer în concentrații de peste 1:1. Nu interferă tiofenul, mercaptanii și sulfura de metil.

Reactivi

1. Soluție absorbantă: dietilamină sau piperidină p.a. soluție 1% din alcool etilic de 95° (v/v) (dacă aminele sînt colorate, se distilă). 2. Acetat de cupru, $(CH_3COO)Cu \cdot H_2O$ p.a. soluție 0,05% în alcool etilic de 95°. 3. Soluție standard stoc: se cîntărește sulfură de carbon pură, în soluție alcoolică de dietilamină sau piperidină, astfel încît să se obțină o soluție cu o concentrație de aproximativ 1 mg/ml. Soluția se poate conserva mai multe zile, în flacon brun, bine închis, la rece și întuneric. 4. Soluție standard de lucru: se diluează soluția standard stoc cu apă, pentru a obține o soluție cu 100 μg sulfură de carbon/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 0,2 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 9 ml soluție absorbantă și cîte 1 ml soluție de acetat de cupru. La apariția primei culori galbene sau galben-brună, se întrerupe recoltarea aerului.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu aceiași reactivi, care se transportă în teren fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul fiecărui absorbitor în cîte o eprubetă gradată și se aduce la 10 ml cu soluție absorbantă.

În paralel, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 425$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Scanned with OKEN Scanner

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 140 μg, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2 de CS_2, în μg, din cele două absorbitoare montate în serie.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg sulfură de carbon/m^3 aer :

$$\text{mg } CS_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V}$$

în care :

C_1 și C_2 = concentrația sulfurii de carbon, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Între recoltarea probelor și citirea extincțiilor nu trebuie să treacă mai mult de 5 ore. Dacă aceasta nu este posibil, se procedează astfel : se recoltează aer prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 9 ml soluție alcoolică de amină secundară, fără acetat de cupru, volumul de aer fiind de 0,5—1,0 litri ; în laborator se adaugă cîte 1 ml soluție acetat de cupru și se lucrează în continuare ca mai sus.

2. În cazul prezenței în aer a hidrogenului sulfurat în concentrații ce depășesc cu mult concentrația sulfurii de carbon, se atașează înaintea absorbitoarelor, fie o alonjă cu vată de bumbac azbest, sau hîrtie de filtru îmbibate cu acetat de plumb 10%, fie un vas spălător conținînd o soluție de arsenit de sodiu 5% sau hidroxid de sodiu 5% sau clorură de cadmiu 2% (simplă sau cu adaos de 2 ml hidroxid de sodiu 0,5 N).

D. **Dozare din urină a metaboliților sulfurii de carbon**

1. *Metoda spectrofotometrică (testul cu iodazidă)*

Principiu

Dietilditiocarbamații urinari, (DDTC), metaboliți ai sulfurii de carbon, conținînd legătura C = S, catalizează reacția de reducere a iodului de către azida de sodiu, reacție care, în mod spontan, nu are loc. Intensitatea reacției, deci cantitatea de iod redusă dintr-o soluție de iod titrată, este proporțională cu concentrația acestor metaboliți.

Reactivi

1. Azidă de sodiu, soluție 2 M ; 2. Iodura de potasiu, soluție 0,130 M (în care se dizolvă iod corespunzător concentrației de 0,065 M) ; 3. Acid clorhidric 6 N ; 4. Tetraclorură de carbon ; 5. Dietilditiocarbamat de sodiu soluție 1 milimolar ; 6. Reactiv de lucru : în momentul întrebuințării, se prepară sub nișă, răcind la gheață, un amestec din : 50 ml soluție azidă de sodiu, 20 ml soluție iodură de potasiu, 40 ml HCl 6 N. Se controlează *p*H-ul care trebuie să fie 5,2 (se lucrează cu atenție, căci din reacție rezultă acid azothidric, foarte toxic).

Recoltarea probelor

Dietilditiocarbamații se lucrează în urină proaspătă, recoltată înainte și după expunere.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Se diluează probele de urină cu apă 1 : 10 ; 1 : 20 sau 1 : 40 etc. în funcție de nivelul de expunere la toxic a subiectului. În eprubete gradate de 25 ml se pipetează cîte 2,5 ml reactiv de lucru și 1 ml urină diluată. În paralel se prepară un martor din 2,5 ml reactiv de lucru și 1 ml apă. Probele de urină și proba martor se incubează 30 minute la 37°C. Se completează volumul la 25 ml cu apă. Într-o pîlnie de separare se pipetează cîte 5 ml din conținutul fiecărei eprubete gradate și se adaugă 5 ml tetraclorură de carbon. Se agită 30 secunde și, după separarea fazelor, se trece faza organică, printr-un filtru, într-o eprubetă.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 525$ nm, în cuvă de 1 cm față de apă saturată cu tetraclorură de carbon, 5 : 5 (v/v).

Curba de etalonare se întocmește pornind de la soluția standard de dietilditiocarbamat de sodiu 1 milimolar, prin puncte între 0 și 0,1 micromoli în probă, astfel : se iau 0,05 ml ; 0,1 ml ; 0,2 ml etc. din soluția standard, corespunzînd la 0,01 ; 0,02 ; 0,04 etc. micromoli DDTC în probă, se completează volumul la 1 ml cu apă și se lucrează ca și probele de 1 ml urină diluată. Curba este descendentă : extincția maximă este dată de proba martor și corespunde concentrației zero în DDTC. Extincțiile probelor se extrapolează direct pe curba etalon, măsurîndu-se astfel iodul restant din probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în micromoli DDTC/litru urină.

1 micromol DDTC reduce 120 micromoli iod.

II.4.10. MERCAPTANII

A. **Izolare**

Mercaptanii, R—SH ($R = CH_3$, C_2H_5, C_4H_9) se izolează din aer prin reținere în soluție de acetat mercuric 5%.

B. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Mercaptanii reacționează cu paradimetilfenilendiamina în mediu acid și în prezența clorurii ferice, dînd un compus roșu colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 0,1 µg mercaptan/ml. Interferența H_2S poate fi înlăturată prin reținere într-un absorbitor cu soluție apoasă de acetat de cadmiu 2% sau acetat de zinc 2%, montat înaintea absorbitoarelor pentru determinarea mercaptanilor.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : acetat mercuric, $Hg(CH_3COO)_2$ soluție 5% (reactivul este toxic) ; 2. Paradimetilfenilendiamină clorhidrică : se dizolvă 0,5 g paradimetilfenilendiamină în 100 ml HCl d = 1,19. Soluția trebuie să fie incoloră și se prepară extemporaneu ; 3. Clorură ferică : se dizolvă 6,8 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ în 100 ml HCl 10% ; 4. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,3136 g mercaptidă de plumb cristalizat în 15 ml HCl 0,1 N și se completează la 100 ml cu apă ; 1 ml = 1 mg metilmercaptan (sau 1,29 mg etilmercaptan, 1,58 mg propilmercaptan, 1,87 mg butilmercaptan) ; 5. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă distilată, în pro-

Scanned with OKEN Scanner

porție de 1:50; 1 ml = 20 μg metilmercaptan (sau 25,8 μg, respectiv 31,6 și 37,4 μg, etil, respectiv propil și butilmercaptan).

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 0,3—0,5 litri/minut prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 5 ml soluție asorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește conținutul microabsorbitoarelor prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Se adaugă la această soluție 3 ml soluție de paradimetilfenilendiamină și 4 picături de soluție de clorură ferică.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția după 30 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 2 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg metilmercaptan, prin puncte din 10 în 10 în condițiile descrise mai sus. Extincțiile pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C, a metilmercaptanului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg metilmercaptan/m³ aer:

$$\text{mg metilmercaptan/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația metilmercaptanului, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

II.4.11. NITROBENZENUL

A. **Izolare**

Nitrobenzenul se izolează din aer prin reținere în celosolv.

B. **Identificare**

1. *Reducerea grupării* NO_2 *și* NH_2*:* la 5 ml soluție de analizat se adaugă 0,5 ml HCl d = 1,19 și o granulă de zinc; soluția conținînd anilină se alcalinizează ușor și se execută reacțiile de identificare a anilinei (v. Amine aromatice).

2. *Diferențierea nitrobenzenului de benzaldehidă:* ambele substanțe au miros caracteristic de migdale amare, însă nitrobenzenul spre deosebire de benzaldehidă, nu se dizolvă în bisulfit de sodiu.

C. **Dozare din aer**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Nitrobenzenul este redus cu amalgam de zinc în mediu acid cu formare de anilină. Aceasta, după diazotare, este cuplată cu sarea de sodiu a acidului 2-naftol-3,6-disulfonic (sarea R).

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi

1. Celosolv (se folosește celosolvul care distilă între 133°C și 136°C). 2. Amalgam de zinc. O cantitate de pulbere de zinc p.a. este introdusă într-un balon cu fund rotund. Se adaugă o soluție saturată de clorură mercurică în apă, astfel ca să se acopere toată pulberea de zinc. Se agită energic balonul și se lasă în repaus 10 minute. Se filtrează sub presiune scăzută și se spală din abundență cu apă distilată. Se aduce amestecul într-un borcan, unde se păstrează sub apă. 3. Soluție de sare R. Se dizolvă 15 g sare R în 50 ml apă distilată fierbinte. Se alcalinizează slab cu o soluție de carbonat de sodiu (*p*H 9) și se răcește. Se filtrează și se completează la 100 ml cu apă distilată. Se păstrează în sticle brune bine închise. 4. Nitrit de sodiu, soluție 0,5 M. Se dizolvă 3,45 g nitrit de sodiu în apă și se diluează pînă la 100 ml cu apă distilată. Se păstrează la rece și se prepară proaspăt la fiecare două zile. 5. Soluție standard stoc. Se cîntărește exact un balon cotat de 25 ml, care conține aproximativ 10 ml celosolv. Se adaugă 2—3 picături de nitrobenzen și se recîntărește. Se calculează concentrația în nitrobenzen. 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu celosolv, astfel încît să se obțină o soluție cu 10 μg/ml. 7. Acid clorhidric, soluție 1 M și 3 M. 8. Carbonat de sodiu, soluție 1 M. 9. Hidroxid de amoniu, soluție 3 M.

Recollarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de maximum 1 litru/minut, prin două microabsorbitoare conținînd cîte 5 ml celosolv.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, cu cîte 5 ml celosolv, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitoarelor într-un balon cotat de 25 ml. Se spală microabsorbitoarele cu porțiuni repetate de apă, colectînd apele de spălare tot în balonul cotat, pînă la 25 ml volum final. Se introduc 10 ml din soluția obținută într-un balon cu fund rotund de 100 ml prevăzut cu refrigerent de reflux. Se adaugă 3 ml soluție de HCl 3 M și imediat aproximativ 0,2 g amalgam de zinc (esorat prin presare). Se încălzește ușor la fierbere sub reflux timp de 10 minute. După 5 minute de la începerea fierberii se adaugă, peste amestecul din balon, prin extremitatea liberă a refrigerentului, 5 ml celosolv, pentru a spăla pereții refrigerentului și ai balonului. Se răcește balonul și se filtrează conținutul său, spălînd precipitatul de pe filtru de două ori cu cîte 5 ml apă. Se aduce filtratul și apele de spălare într-o eprubetă, se răcește la 5°C și se adaugă 2 ml HCl 1 M și 0,1 ml soluție de nitrit de sodiu. Se agită și se lasă în repaus 5 minute, se trece conținutul eprubetei într-un balon cotat de 50 ml în care se aflau 10 ml soluție carbonat de sodiu 1 M și 0,1 ml soluție de sare R. Se agită și se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă 5 ml soluție de hidroxid de amoniu 3 M (sau atîta soluție cît este necesară pentru a solubiliza carbonatul de zinc format) și se diluează la 50 ml cu hidroxid de amoniu 3 M.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 490$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Scanned with OKEN Scanner

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 50 μg prin puncte din 10 în 10, astfel : se iau din soluția standard de lucru, 0; 1 ; 2 ; 3 ; 4 și 5 ml, se completează la 10 ml cu celosolv și se prelucrează identic cu probele, începînd cu faza de reducere a nitrobenzenului. Extincțiile pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a nitrobenzenului, în μg.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg nitrobenzen/m³ aer.

$$\text{mg nitrobenzen/m}^3 \text{ aer} = \frac{C \cdot 5}{V}$$

în care :

C = concentrația nitrobenzenului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

II.4.12. AMINELE AROMATICE

A. **Izolare**

Aminele aromatice se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar din produse biologice prin distilare sau antrenare cu vapori de apă, după alcalinizare la *p*H 8—9. Metaboliții se izolează prin antrenare cu vapori de apă sau extragere cu solvenți organici.

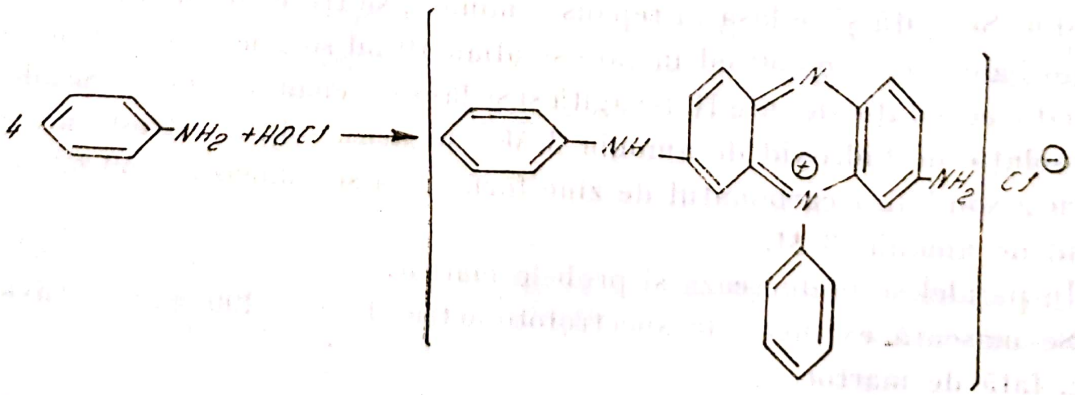
B. **Identificare**

— *Anilina*

1. *Reacția Hoffmann (reacția izonitrilului)* : la 1 ml soluție de analizat se adaugă 0,5 ml soluție alcoolică de KOH 10%, 2 picături de cloroform și se aduce la fierbere, cînd se dezvoltă un miros neplăcut de izonitril (fenilcarbilamină) :

$$C_6H_5{-}NH_2 + 3\ KOH + CHCl_3 \rightarrow C_6H_5{-}N{=}C + 3\ KCl + 3\ H_2O$$

2. *Reacția moveinei :* se tratează 1 ml soluție de analizat cu 1 ml hipoclorit de sodiu 10%, cînd apare o coloratie albastră, care virează încet la roșu-murdar. Dacă se extrage cu eter etilic, faza eterică se colorează în roșu. Sensibilitatea reacției este crescută prin adaus de sulfură de amoniu sau hipoclorit de calciu :



3. *Reacția Jacquemin :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml fenol 1% și 0,5 ml hipoclorit de sodiu 10%, cînd apare o coloratie albastră, prin formarea indofenolului (v. Fenolul).

— *Para-fenilendiamina (coloranți „ursol")*

1. *Reacția cu anilină și clorură ferică :* la 1 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml soluție de anilină 1% și 1 ml soluție de $FeCl_3$ 5%, cînd apare o coloratie albastră, indicînd prezența paradiaminelor aromatice.

C. Dozare din aer

1. *Metoda spectrofotometrică pentru anilină, toluidină, xilidină, cloranilină, toluilendiamină*

Principiu

Anilina, $C_6H_5NH_2$, toluidina, $NH_2C_6H_4CH_3$, xilidina, $NH_2C_6H_3(CH_3)_2$, cloranilina, $NH_2C_6H_4Cl$, toluilendiamina, $(NH_2)_2C_6H_3CH_3$, dau prin diazotare și cuplare cu 1-N-naftiletilendiamină (NED) un colorant azoic, colorimetrabil.

Reactivi

1. Acid clorhidric conc. d = 1,19. 2. Nitrit de sodiu, soluție 0,25% (se prepară extemporaneu). 3. Sulfamat de sodiu sau de amoniu soluție 5% (se păstrează o săptămînă la rece). 4. Soluție de cuplare: se dizolvă 0,05 g 1-N-naftiletilendiamină (NED) în 25 ml apă, se adaugă 1 ml HCl conc. și se aduce cu apă la 50 ml (se conservă o săptămînă la rece, ferit de lumină). 5. Soluție absorbantă : acid clorhidric 0,01 N. 6. Acid clorhidric 1 N. 7. Soluție standard stoc. În cazul anilinei, orto- și meta-toluidinei, orto-, meta- și para-xilidinei, se cîntărește exact un balon cotat de 25 ml care conține aproximativ 5 ml HCl 1 N. Se adaugă 2—3 picături din amina respectivă, se recîntărește, se completează la semn cu HCl 1 N, se omogenizează și se calculează conținutul de amină pe mililitru de soluție. În cazul para-toluidinei, cloranilinei și toluilendiaminei care sînt cristalizate sau în cazul în care pentru etalonul de anilină se folosesc clorhidratul sau sulfatul, soluția standard stoc se prepară prin dizolvarea a 0,1 g substanță (sau în cazul sărurilor anilinei, cantitatea corespunzătoare la 0,1 g anilină bază) în 100 ml HCl 1 N. 8. Soluție standard de lucru. În cazul aminelor lichide, se ia un alicot din soluția standard stoc care să conțină 1 mg amină, se introduce într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu HCl 1 N. Soluția conține 10 μg amină/ml. În cazul aminelor cristalizate sau a sărurilor anilinei, se diluează un alicot din soluția standard stoc cu HCl 1 N, în proporție de 1 : 100.

Recoltarea probelor

Dispozitivul de recoltare se alege în funcție de starea de agregare a aminei : vapori, aerosoli, pulberi. Se aspiră aer minimum 50 litri, cu un debit de 2 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, care conțin cîte 10 ml HCl 0,01 N. Dacă aminele se află sub formă de pulberi se utilizează un dispozitiv filtrant cu două rondele suprapuse de hîrtie de filtru umectate cu HCl 0,01 N.

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 10 ml HCl 0,01 N, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată. Dacă s-au recoltat probele prin filtrare, se extrage materialul filtrant cu două porțiuni a cîte 5 ml HCl 0,01 N, care se reunesc apoi într-o eprubetă gradată. Se aduce la 10 ml lichidul din fiecare eprubetă, cu HCl 0,01 N. Se adaugă 1 ml soluție de nitrit de sodiu, se agită, se lasă în repaus 15 minute (preferabil la o temperatură de 5—15°C), se adaugă 1 ml soluție de sulfamat, se agită puternic, se lasă în repaus 2 minute, apoi se adaugă 1 ml reactiv de cuplare NED, se agită, se aduce la 15 ml cu apă, se lasă în repaus pentru dezvoltarea culorii, conform timpului specificat în tabelul 4

Tabelul 4

Lungimea de undă și timpul de cuplare caracteristice aminelor aromatice

Amina care se dozează	*Lungimea de undă la care se măsoară extincția* (nm)	*Timpul de cuplare (minute)*
Anilină	500	10
Toluidină (orto)	505	60
Toluidină (meta)	505	10
Toluidină (para)	505	10
Xilidină (2,4)	505	180
Xilidină (3,4)	515	45
Xilidină (2,5)	500	120
Cloranilină (orto)	500	60
Cloranilină (meta)	500	10
Cloranilină (para)	505	10
Toluilendiamină (2,4)	530	1,5—2
Toluilendiamină (2,6)	530	60

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la lungimea de undă specificată în tabel, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 50 μg, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Este obligatoriu ca să se respecte aceleași condiții de temperatură — o temperatură aleasă între 5 și 15°C — în care

Scanned with OKEN Scanner

s-au lucrat și probele. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C de amină aromatică, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg amină aromatică/m³ aer :

$$\text{mg amină aromatică/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = valorile însumate ale concentrațiilor din cele două absorbitoare montate în serie (în cazul recoltării în acest mod), în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

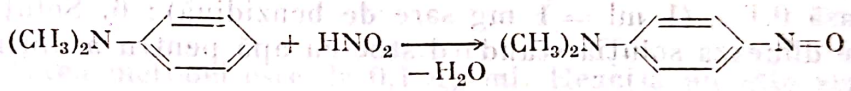
Observații

Măsurarea extincțiilor și timpul necesar dezvoltării culorii se execută conform tabelului 4.

2. *Metoda spectrofotometrică pentru dimetilanilină*

Principiu

Dimetilanilina, $C_6H_5N(CH_3)_2$, reacționează cu nitritul de sodiu în mediu de acid clorhidric, dînd un nitrozoderivat de culoare roșie-portocalie, colorimetrabil :



Reactivi

1. Soluție absorbantă : acid clorhidric 10% ; 2. Nitrit de sodiu, soluție 10% ; 3. Soluție standard stoc : soluție de dimetilanilină cu un conținut de 1 mg/ml ; 4. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc 1 : 10, pentru a obține o soluție cu 100 μg/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 0,4 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se iau 5 ml din conținutul absorbitorului, se adaugă 2 ml nitrit și se agită.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 100 μg, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă) obținîndu-se concentrația C a dimetilanilinei, în μg, în probă.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg dimetilanilină/m³ aer :

$$\text{mg dimetilanilină/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația dimetilanilinei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

3. *Metoda spectrofotometrică pentru benzidină*

Principiu

Benzidina, $H_2N-C_6H_4-NH_2$, sub formă de clorhidrat sau sulfat se tetraazotează în mediu de acid clorhidric cu nitrit de sodiu. Sarea de tetrazoniu formată se cuplează cu rezorcină, rezultînd 4,4 — metadioxibenzentetrazobenzidină, de culoare violetă, foarte stabilă în soluție alcalină, colorimetrabilă.

Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Reacția nu este specifică, deoarece reacția de diazotare și cuplare este comună tuturor aminelor aromatice.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : acid clorhidric 10% ; 2. Nitrit de sodiu, soluție 5%, proaspăt preparată. 3. Rezorcină, soluție 0,5% ; 4. Hidroxid de sodiu, soluție 40% ; 5. Soluție standard stoc clorhidrat sau sulfat de benzidină, soluție apoasă 0,1% (1 ml = 1 mg sare de benzidină) ; 6. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard-stoc cu apă pentru a obține o soluție cu 1 μg/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 15 litri de aer, cu un debit de 1—2 litri/minut, printr-un absorbitor conținînd 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două cu cîte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul absorbitoarelor cantitativ în cîte o eprubetă gradată. Se răcesc eprubetele într-un pahar cu apă rece sau cu cuburi de gheață și se adaugă 0,5 ml soluție nitrit și 0,5 ml soluție rezorcină. Se agită și se adaugă 2 ml soluție hidroxid.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția după 5—10 minute la spectrofotometru, la λ = = 530 nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 2 și 10 μg, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a benzidinei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg benzidină/m³ aer :

$$\text{mg benzidină/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația benzidinei, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

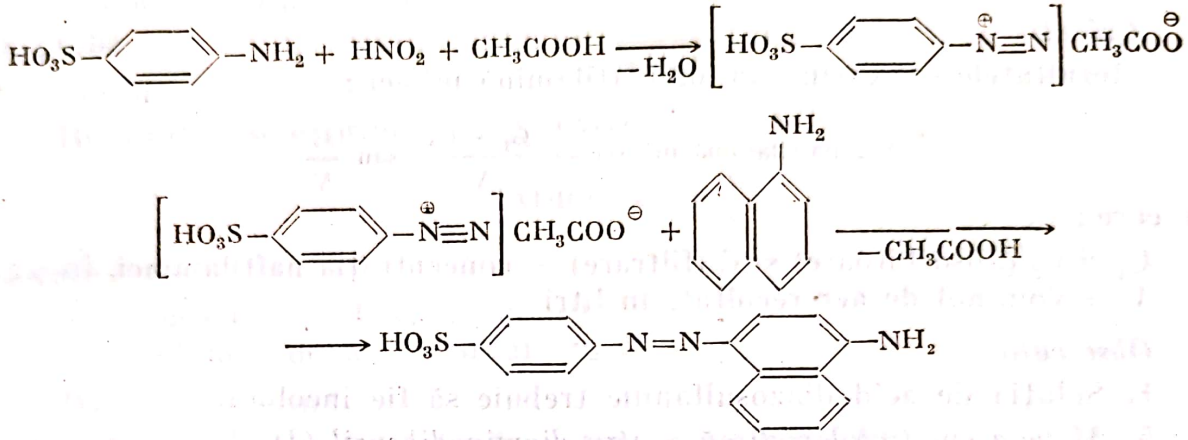
Observații

1. Diazotările se execută, în general, între 0° și 20°C, din cauza instabilității acestor produși. 2. Difenolii, ca rezorcina și dioxinaftalina, cuplează de două ori în mediu alcalin. 3. După unii autori, cuplarea fenolilor este cantitativă și se realizează mai ușor decît aceea a aminelor.

4. *Metoda spectrofotometrică pentru naftilamine*

Principiu

Naftilaminele, $C_{10}H_7-NH_2$ se cuplează cu acidul sulfanilic diazotat, dînd un diazoderivat de culoare roșie, colorimetrabil :



Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Reacția nu este specifică naftilaminelor.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : alcool etilic de 95° acidulat cu acid sulfuric (25 ml alcool și 5 ml H_2SO_4 10%). 2. Acid sulfanilic, soluție 0,3% în acid acetic 10%. 3. Nitrit de sodiu, soluție 1%, proaspăt preparată. 4. Soluție de acid diazosulfanilic : se prepară extemporaneu prin adăugarea, la rece și sub agitare, a 1 ml soluție nitrit de sodiu în 10 ml soluție acid sulfanilic. 5. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,1 g naftilamină în 100 ml alcool acidulat. (1 ml = 1 mg naftilamină). 6. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu alcool acidulat în proporție de 1 : 100. (1 ml = 10 μg naftilamină).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 20 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, prin două absorbitoare montate în serie, conținînd cîte 10 ml soluție absorbantă sau cu un debit de 10 litri/minut printr-o alonjă cu vată de sticlă umectată cu 1—2 ml soluție absorbantă sau printr-un dispozitiv filtrant cu două rondele suprapuse de hîrtie de filtru, în funcție de starea fizică a aminei (aerosoli sau pulberi).

În afară de dispozitivele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitoarelor în cîte o eprubetă gradată. În cazul recoltării prin filtrare, se extrage materialul filtrant cu două porțiuni de cîte 5 ml soluție absorbantă, care se reunesc apoi în eprubetă

Scanned with OKEN Scanner

gradată. Se completează conținutul fiecărei eprubete la 10 ml cu soluție absorbantă, se adaugă cîte 0,2 ml acid diazosulfanilic și se agită.

În paralel se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 25 μg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrațiile C_1 și C_2 de naftilamină, în μg (în cazul recoltării prin absorbitoare) și concentrația C (în cazul recoltării prin filtrare).

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg naftilamină/m^3 aer :

$$\text{mg naftilamină/m}^3 \text{ aer} = \frac{C_1 + C_2}{V} \text{ sau } \frac{C}{V}$$

în care :

C_1 și C_2 (absorbitoare) și C (filtrare) = concentrația naftilaminei, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

1. Soluția de acid diazosulfanilic trebuie să fie incoloră.

5. *Metoda spectrofotometrică pentru diaminodibenzil (DADB)*

Principiu

Clorhidratul de diaminodibenzil (DADB), $H_2N-C_6H_4-(CH_2)_2-C_6H_4-NH_2$ este diazotat cu nitrit de sodiu în mediu de acid clorhidric. Excesul de nitrit este descompus cu sulfamat de amoniu, iar grupările de diazoniu sînt cuplate cu 1-N-naftiletilendiamină (NED), cu formarea unui compus violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 2 μg/8 ml.

Reactivi

1. Soluție absorbantă, acid clorhidric 5%. 2. Nitrit de sodiu 0,25%. Se prepară extemporaneu. 3. Sulfamat de amoniu 2,5%. 4. Soluție de cuplare : se dizolvă 0,025 g 1-N-naftiletilendiamină (NED) în 25 ml apă, la care se adaugă 1 ml HCl concentrat și se completează la 50 ml cu apă distilată. Soluția se poate păstra la rece o săptămînă. 5. Soluție standard stoc : se aduc într-un balon cotat de 100 ml, 100 mg diaminodibenzil și se completează la semn cu HCl 5% (1 ml = 1 mg DADB). 6. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu HCl 5%, în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg DADB).

Recoltarea probelor

Se aspiră 15—20 l aer, cu un debit de 1—2 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două cu cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a recolta aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se reunește, prin transvazare, conținutul microabsorbitoarelor, într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Se iau

Scanned with OKEN Scanner

5 ml soluție, se adaugă 1 ml nitrit de sodiu, se agită și se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă apoi 1 ml sulfamat de amoniu, se agită și se lasă 10 minute, după care se adaugă 1 ml soluție de cuplare.

În paralel, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 565$ nm, în cuvă de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 2 și 10 μg DADB, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din soluția absorbantă) obținîndu-se concentrația C, a DADB, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DADB/m³ aer :

$$\text{mg DADB/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația DADB, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Dozare din urină

1. *Metoda spectrofotometrică pentru para-aminofenol*

Principiu

Para-aminofenolul, în mediu alcalin, se cuplează cu fenolul, cu formare de indofenol.

Reactivi

1. Acid clorhidric, d = 1,19. 2. Fenol, soluție apoasă 5%, din fenol cristalizat. 3. Amoniac, d = 0,9. 4. Soluție standard stoc : se dizolvă 0,1 g para-aminofenol în 100 ml HCl 0,1 N sau 0,1334 g clorhidrat de para-aminofenol în 100 ml apă (1 ml = 1 mg para-aminofenol).

Recoltarea probelor

Se recoltează urina spot sau se colectează urina din 24 ore. Urina se recoltează la ieșirea din lucru sau în primele 48 ore de la expunere.

Modul de lucru

Se introduc, într-o eprubetă, 10 ml urină și 5 ml HCl concentrat. Se astupă eprubeta cu un tampon de vată învelit în celofan sau polietilenă și se menține într-o baie de apă la fierbere timp de 90 minute. Se răcește, se filtrează într-un cilindru gradat de 100 ml și se completează cu apă la 100 ml. Se măsoară, într-o eprubetă, 2 ml filtrat (1/50 din probă), 5 ml apă, 1 ml fenol și 2 ml amoniac și se omogenizează.

În paralel se prelucrează o probă martor din 2 ml filtrat și 8 ml apă.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 600$ nm, în cuva de 1 cm, față de martor.

Curba de etalonare se întocmește între 50 și 200 mg para-aminofenol/litru urină, în modul următor : într-o serie de eprubete, se măsoară cîte 10 ml urină

Scanned with OKEN Scanner

de la o persoană neexpusă și se adaugă cîte 0,1 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ml soluție standard de lucru, apoi se prelucrează ca pentru probe. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a para-aminofenolului, în mg/litru urină.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg para-aminofenol/litru urină. Deoarece curba etalon s-a întocmit în mg para-aminofenol/litru urină,

mg para-aminofenol/litru urină = C

Interpretarea rezultatelor

Para-aminofenolul este principalul metabolit al anilinei. La persoanele neexpuse, nu se decelează para-aminofenol în urină, sau, în cazuri rare, concentrații de ordinul cîtorva micrograme/litru. În urma expunerii la vapori de anilină, se elimină cantități de ordinul miligramelor/litru de para-aminofenol liber sau glucuronoconjugat.

E. Determinări biochimice

1. *Dozarea methemoglobinei*

Principiu

Se măsoară în banda de absorbție caracteristică methemoglobinei (Hi), la 630 nm, *Hi existentă*, prin diferența dintre absorbția la 630 nm, *ca atare*, apoi *după transformare în cianmethemoglobină* (CNHi), care absoarbe foarte puțin în această bandă.

În paralel se obține *hemoglobina totală* prin tratare cu fericianură și transformare în CNHi. Se calculează proporția de Hi din Hb totală.

Reactivi

1. Soluție tampon fosfați, *p*H 6,7 (66,7 mM). Se prepară soluții 66,7 mM din : a) fosfat monopotasic, KH_2PO_4, dizolvînd 908 mg în 100 ml apă ; b) Fosfat disodic, $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$, dizolvînd 1,187 g în 100 ml apă. Se amestecă soluțiile a) și b), se adaugă 0,6 ml cloroform, se agită energic și se conservă la frigider. 2. Fericianură de potasiu, 152 mM : se dizolvă 100 mg fericianură de potasiu în 2 ml apă. Nu se conservă. 3. Cianură de potasiu, 77 mM : se dizolvă 100 mg cianură de potasiu în 2 ml apă. Nu se conservă.

Recoltarea probelor

Se folosește sînge total, recoltat pe anticoagulant (heparină, oxalat) și omogenizat prin răsturnare repetată înaintea pipetării. Probele de sînge se analizează pînă la maximum 3 ore de la recoltare, deoarece *in vitro* proporția de methemoglobină crește în timp mai îndelungat.

Modul de lucru

Se pipetează 0,2 ml sînge în 5 ml apă. Se amestecă și se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă 5 ml soluție tampon, se amestecă și se centrifughează 10 minute la 3 000 rpm.

Se pipetează în două cuve de spectrofotometru : o probă pentru hemoglobina totală (T) și o probă pentru methemoglobină (M).

Scanned with OKEN Scanner

Se folosesc următorii reactivi :

Reactivi/eprubeta		*T*	*M*
Supernatant de la centrifugare	ml	2,5	2.5
Fericianură	picături	1	—
Apă	picături	—	1
Se amestecă prin răsturnare și se măsoară extincția (ET_1 și EM_1) la 630 nm, față de apă, în cuva de 1 cm. Se adaugă în cuve :			
Cianură	picături	1	1
Se amestecă prin răsturnare și se măsoară, după 5 minute, extincțiile (ET_2 și EM_2) în aceleași condiții.			

Calcul

$ET_1 - ET_2$ este proporțional cu *hemoglobina totală* (HbT)
$EM_1 - EM_2$ este proporțional cu *methemoglobina prezentă* (Hi)

$$\text{Hi \% din HbT} = \frac{EM_1 - EM_2}{ET_1 - ET_2} \cdot 100$$

Observații

Pentru a exprima valoarea Hi în g/100 ml, se dozează hemoglobina totală și se calculează cantitatea de Hi corespunzătoare procentului găsit.

Interpretarea rezultatelor

Principala manifestare toxică a aminoderivaților aromatici este acțiunea methemoglobinizantă. În mod normal procentul de methemoglobină este de 1,5% din hemoglobina totală. La persoanele expuse la aminoderivați aromatici, acest procent poate fi mult crescut.

2. *Identificarea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (G-6-PDH)*

Principiu

La incubarea hemolizatelor cu glucozo-6-fosfat (G-6-P) și nicotinamid-adenindinucleotidfosfat oxidat (NADP) are loc, sub acțiunea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei (G-6-PDH) reacția de formare a acidului 6-fosfogliceric (6-PG) și nicotinamidadenindinucleotidfosfat redus (NADPH)

$$\text{G—6—P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G—6—PDH}} \text{6—PG} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Deoarece 6-fosfatgluconatdehidrogenaza (6-PGDH) este practic prezentă în toate hemolizatele, are loc, în continuare, reacția dintre 6-PG și NADP :

$$\text{6—PG} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{6—PGDH}} \text{ribozo-5-fosfat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Cînd se incubează hemolizate ușor deficiente în G-6-PDH se formează, în aceste condiții, o cantitate mică de NADPH. În prezența glutationului oxidat (GSSG) introdus în amestecul de reacție, NADPH este reoxidat la glutation redus (GSH) sub acțiunea glutation-reductazei :

$$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{glutation-reductază}} 2\ \text{GSH} + \text{NADP}$$

Scanned with OKEN Scanner

iar fluorescența caracteristică NADPH nu apare, sau apare slab. La persoanele cu activitate normală a G-6-PDH, activitatea acesteia depășește activitatea glutation-reductazei și fluorescența caracteristică NADPH poate fi pusă în evidență. Prin urmare, în această metodă, prin observarea fluorescenței prezentate de NADPH în U.V. la 366 nm, se determină de fapt diferența dintre activitățile G-6-PDH și a glutation-reductazei.

Reactivi

Se prepară un reactiv care conține pe 1 ml următoarele substanțe: glucozo-6-fosfat 0,01 mM, 100 microlitri; NADP 7,5 nm, 100 microlitri; saponină 1%, 200 microlitri; tampon TRIS-HCl, 750 mM, *p*H 7,8, 300 microlitri; GSSG 8 mM, 100 microlitri; apă bidistilată, 200 microlitri. Amestecul este stabil mai multe luni, la congelator.

Modul de lucru

Se recoltează sînge pe heparină sau EDTA (poate fi păstrat la congelator cîteva săptămîni). Se amestecă 10 microlitri sînge total cu 0,1 ml reactiv. Se spotează imediat 20 microlitri din amestecul sînge-reactiv pe o rondelă de hîrtie de filtru. Peste 10 minute se spotează alături o nouă probă de 20 microlitri din acest amestec. Se lasă să se usuce și se urmărește fluorescența la lampa Wood la 366 nm. Se notează fluorescența cu (—), (±), (+), după cum hemolizatul a provenit de la deficienți sau normali în G-6-PDH.

II.4.13. ACIDUL CIANHIDRIC ȘI DERIVAȚI

A. **Izolare**

Acidul cianhidric și derivații săi se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante. Acidul cianhidric se izolează din produse biologice și alte produse prin distilare în mediu slab acid. Izolarea din glicozizi necesită, în prealabil, o hidroliză.

B. **Identificare**

1. *Reacții prealabile* (identificare din aer, conținut stomacal, organe, sînge).

Se execută cu ajutorul hîrtiilor indicatoare; în cazul organelor (conținutului stomacal), hîrtiile se suspendă de capacul recipientelor în care se găsesc produsele, avînd grijă să nu vină în contact cu acestea.

a) *Reacția Schönbein:* hîrtia îmbibată cu sulfat de cupru 0,05%, apoi cu guaiac 1% în alcool, se colorează în albastru:

$$CuSO_4 + 2\,HCN = Cu(CN)_2 + H_2SO_4$$

$$2\,Cu(CN)_2 + H_2O = 2\,CuCN + 2\,HCN + O$$

Reacția este sensibilă (1/300 000), aproape instantanee, dar nespecifică fiind dată și de substanțele oxidante (clor, ozon etc.).

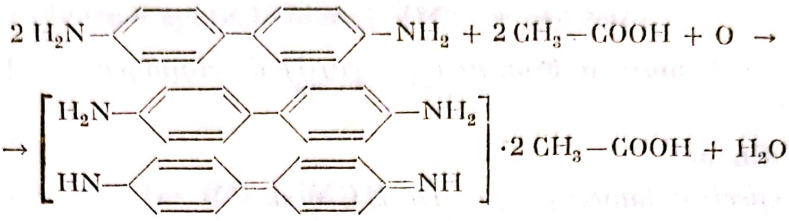
b) *Reacția Gastaldi:* hîrtia îmbibată cu acetat de cupru 0,28% și apoi cu acetat de benzidină 0,5% se colorează în albastru. Reacția se bazează pe o

Scanned with OKEN Scanner

dismutație cu formare de oxigen în stare născîndă, care oxidează benzidina la produsul merichinoidic, albastru :

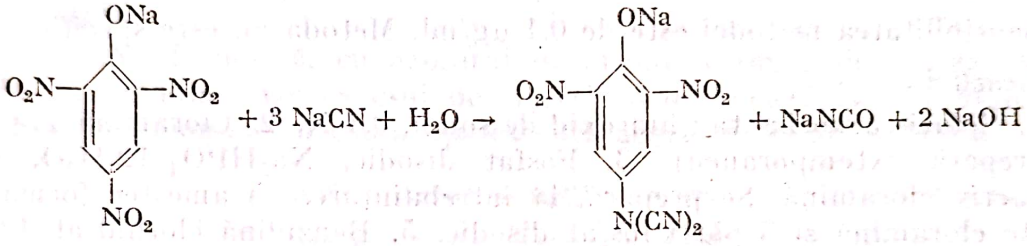
$$(CH_3-COO)_2Cu + 2\,HCN = Cu(CN)_2 + 2\,CH_3-COOH$$

$$2\,Cu(CN)_2 + H_2O = 2\,Cu(CN) + 2\,HCN + O$$



Reacția este sensibilă, dar nespecifică.

c) *Reacția Guignard :* hîrtia îmbibată cu acid picric 1%, uscată, tratată cu carbonat de sodiu 5% și uscată la temperatura laboratorului, se înroșește prin formarea izopurpuratului :



Reacția este specifică, sensibilă, dar se desfășoară lent.

2. *Reacția pe distilat sau lichid absorbant alcalin*

a) *Reacția Guignard* (v. mai sus)

b) *Reacția ferocianurii ferice (tehnica Chelle) :* Soluția de analizat alcalinizată cu borax se tratează cu sulfat feros 2%, reacția trebuind să rămînă alcalină (la fenolftaleină). După cîteva minute se acidulează net cu acid clorhidric, cînd apare culoarea albastră a ferocianurii ferice (albastru de Berlin) :

$$2\,NaCN + FeSO_4 = Fe(CN)_2 + Na_2SO_4$$

$$Fe(CN)_2 + 4\,NaCN = Na_4[Fe(CN)_6]$$

$$6\,FeSO_4 + 3\,O + 3\,H_2O = 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2\,Fe(OH)_3$$

$$3\,Na_4[Fe(CN)_6] + 2\,Fe_2(SO_4)_3 = Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 6\,Na_2SO_4$$

c) *Reacția Liebig (formare de sulfocianură ferică) :* încălzind la fierbere soluția de analizat cîteva picături cu polisulfură de amoniu 10%, se formează sulfocianură de amoniu. Se acidulează cu acid clorhidric pentru distrugerea excesului de polisulfură, se filtrează și se tratează cu $FeCl_3$ 1% (soluție proaspăt preparată), cînd apare o colorație roșie datorită sulfocianurii ferice. Reacția este specifică :

$$CN^- + (NH_4)_2S_2 \rightarrow SCN^- + (NH_4)_2S$$

$$3\,SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe(SCN)_3$$

d) *Reacția cu azotat de argint :* se tratează soluția de analizat cu cîteva picături azotat de argint 1%, cînd se formează un precipitat alb, insolubil

în acid azotic, solubil în cianură alcalină. În exces de azotat de argint apare un precipitat alb de dicianoargentat de argint :

$$KCN + AgNO_3 = AgCN + HNO_3$$

$$AgCN + KCN = K[Ag(CN)_2]$$

$$K[Ag(CN)_2] + AgNO_3 = Ag[Ag(CN)_2] + KNO_3$$

e) *Reacția de formare a bromurii (clorurii) de cianogen* (v. dozarea clorcianului).

C. Dozare din aer

1. *Metoda spectrofotometrică pentru HCN și CN^-*

Principiu

Ionul cian reacționează cu clorul activ eliberat de cloramină, formînd clorcianul. Acesta dă cu piridina aldehida glutaconică, care, cu benzidina formează o bază dibenzidinglutaconică, roșie, colorimetrabilă (v. Dozarea clorcianului).

Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Metoda nu este specifică.

Reactivi

1. Soluție absorbantă : hidroxid de sodiu, 0,1 N. 2. Cloramină T, 0,25% (se prepară extemporaneu). 3. Fosfat disodic, $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$, 1 M. 4. Reactiv cloramină. Se prepară, la întrebuințare, un amestec format din 1 parte cloramină și 3 părți fosfat disodic. 5. Benzidină clorhidrat 4%. Se păstrează în sticle brune, la rece ; dacă se colorează, nu se mai poate întrebuința. 6. Reactiv piridină. La întrebuințare, se prepară un amestec din 60 ml piridină (proaspăt distilată), 10 ml acid clorhidric d = 1,19 și 40 ml apă distilată. 7. Reactiv benzidină-piridină. La întrebuințare, se prepară un amestec din 1 parte benzidină și 5 părți reactiv piridină. 8. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1 g KCN în 100 ml hidroxid de potasiu 1 N. Se titrează cu azotat de argint 0,01 N în prezența unei soluții de iodură de potasiu 20% ca indicator. Se stabilește concentrația exactă în CN^-. 9. Soluție standard de lucru. Se diluează cu apă un alicot din soluția standard stoc, spre a obține o soluție în care 1 ml = 2 μg CN^-.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 5 litri de aer cu un debit de 0,2 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 2 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată de 10 ml și se completează la 6 ml cu apă. Se adaugă 0,2 ml reactiv cloramină și 3 ml reactiv benzidină-piridină, agitînd după fiecare adăugare de reactiv, apoi se completează la 10 ml cu apă distilată. În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția, după 20 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm în cuva de 2 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 2 și 10 μg CN^-, prin puncte din 2 în 2, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația C, a CN^-, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CN^-/m^3 aer :

$$\text{mg } CN^-/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația CN^-, în μg ;

V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Dacă se dozează HCN, rezultatul se înmulțește cu 1,03.

2. *Metoda argentimetrică pentru HCN și CN^-*

Principiu

Ionul CN^- formează, cu azotatul de argint, cianură de argint, AgCN, solubilă în amoniac, iar excesul de $AgNO_3$ reacționează cu KI dînd AgI, insolubilă în amoniac ; această opalescență servește drept indicator :

$$KCN + AgNO_3 = AgCN + KNO_3$$

$$AgCN + 2\ NH_3 = [Ag(NH_3)_2]\ CN$$

$$KI + AgNO_3 = AgI + KNO_3$$

Reactivi

1. Azotat de argint 0,01 N. 2. Iodură de potasiu 10%. 3. Amoniac 10%.

Modul de lucru

Într-un balon Erlenmeyer se aduc 15 ml distilat (lichid absorbant), 2 ml iodură de potasiu 10% și 1 ml amoniac 10%. Se titrează încet cu $AgNO_3$ 0,01 N pînă la apariția unei opalescențe gălbui, care persistă prin agitare.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg HCN % :

$$\text{mg HCN } \% = \frac{a \times f \times 0{,}2701 \times 100}{15}$$

în care :

a = mililitri $AgNO_3$ 0,01 N folosiți la titrare ;

f = factorul soluției de $AgNO_3$ 0,01 N ;

0,2701 factor de corespondență (1 ml $AgNO_3$ 0,01 N = 0,2701 mg HCN) ;

15 = ml distilat luați în lucru.

3. *Metoda colorimetrică liniară pentru HCN și CN^-*

Principiu

Ionul CN^- colorează în albastru pulberea de silicagel impregnată cu acetat de cupru și acetat de benzidină.

Scanned with OKEN Scanner

Sensibilitatea metodei este de 1 μg/litru aer, dacă se lucrează cu 180 ml aer. Reacția este interferată de oxidanți, care dau aceeași reacție, precum și de HCl, H_2S, SO_2, care împiedică formarea compusului albastru.

Reactivi

1. Acetat de cupru, 0,28%. Se conservă în sticle brune. 2. Acid acetic 40%. 3. Benzidină 0,2%. Se dizolvă la cald 0,2 g benzidină în 100 ml apă distilată, se adaugă 0,3 ml acid acetic 40% și se agită. După dizolvarea benzidinei, se păstrează soluția în sticle brune, cu dop rodat. 4. Amestec de reactivi. La întrebuințare se iau volume egale de benzidină și acetat de cupru. 5. Pulbere de silicagel. Silicagel cu diametrul granulelor de 0,5—1,0 mm este fiert de cîteva ori cu apă, decantat, esorat și uscat la 85°C. 6. Pulbere indicatoare. Se tratează 10 g silicagel cu 7,5 ml amestec de reactivi, se omogenizează și se usucă la aer 30 minute. 7. Tuburi indicatoare. Se folosesc tuburi de sticlă cu lungimea de 50 mm și diametrul interior de 2,5 mm, care se pregătesc (în ziua analizei) ca la oxidul de carbon, realizîndu-se însă o lungime a stratului de pulbere de 20 mm.

Modul de lucru

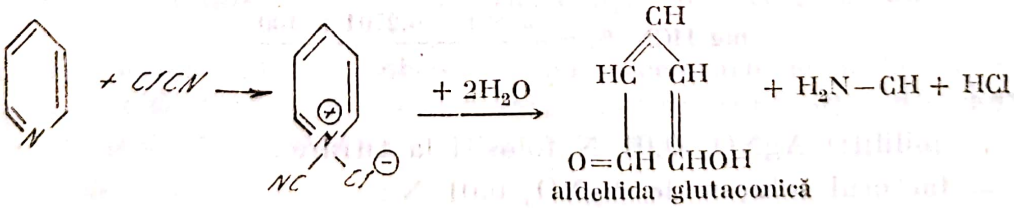
Se aspiră 180 ml aer, timp de 15—18 secunde. Deoarece coloranția albastră dispare rapid, se măsoară imediat lungimea stratului colorat, obținîndu-se concentrația în μg HCN/litru aer după următoarea schemă :

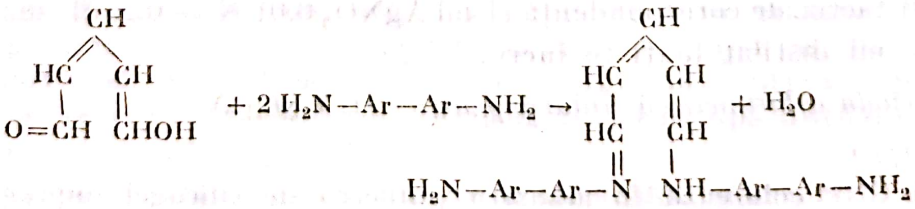
lungimea stratului colorat (mm)	2	5	8	11	14	16,5	17,5	18,5	20
concentrația CN^- (μg/litru)	1	3	4	6	10	20	30	40	50

4. *Metoda spectrofotometrică pentru clorcian*

Principiu

Clorcianul, ClCN, reacționează cu piridina, dînd aldehida glutaconică. Aceasta cuplată cu diamine aromatice, de exemplu, benzidina, formează un compus roz-roșu, colorimetrabil :





Sensibilitatea metodei este de 2 μg/5 ml.

Reactivi

1. Alcool etilic p.a. 2. Acid acetic glacial. 3. Benzidină clorhidrat 1%. 4. Amestec piridină-acid clorhidric : 60 ml piridină, 40 ml apă distilată și 10 ml aicd clorhidric d = 1,19. 5. Amestec de benzidină (reactiv 3) și piridină-acid clorhidric (reactiv 4), în proporție de 2 : 10. 6. Soluție standard stoc. Se barbotează clorcian (lipsit de clor) în acid acetic glacial aflat într-un balon cotat cîntărit. După recîntărire și completare la semn cu acid acetic glacial, se calculează conținutul de clorcian pe ml soluție. Soluția este stabilă timp de o lună. 7. Soluție standard de lucru. Într-un balon cotat se aduce un volum cunoscut de soluție standard stoc, astfel ca, prin diluare cu acid acetic glacial, să se obțină o concentrație de 1 ml = 5 μg. Soluția este stabilă cîteva ore.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 3 ml alcool etilic, 1 ml acid acetic glacial și 1 ml amestec benzidină+piridină+acid clorhidric (reactiv 5). Se recoltează volume de aer astfel calculate, încît culoarea dezvoltată să corespundă la cantități de clorcian cuprinse între 1 și 5 μg/probă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, conținînd aceiași reactivi, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitorului prin care a trecut aerul și care s-a colorat în urma reacției cu clorcianul din aer, se transvazează în cuva de 1 cm cu capac și se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = 530 nm, în compensație cu lichidul din microabsorbitorul martor. Culoarea dezvoltată este stabilă 20 ore.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 5 μg ClCN, prin puncte din 1 în 1, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația ClCN, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg ClCN/m³ aer :

$$\text{mg ClCN/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația ClCN, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Prepararea standardului din clorcian este dificilă, deoarece reclamă o instalație specială pentru producerea, purificarea și barbotarea clorcianului în balonul cotat cu acid acetic glacial, în plus, manipularea toxicului prezintă pericol de intoxicare. Pentru evitarea acestor neajusnuri se înlocuiește clorcianul cu bromcian, care reacționează în mod similar cu nucleul piridinic. Fiind substanță solidă, bromcianul poate fi cîntărit direct, fără instalație specială. Deschiderea recipientului se execută respectînd măsurile obligatorii

Reactivi

1. Alcool etilic p.a. 2. Acid acetic glacial. 3. Benzidină clorhidrat 1%. 4. Amestec piridină-acid clorhidric : 60 ml piridină, 40 ml apă distilată și 10 ml aicd clorhidric d = 1,19. 5. Amestec de benzidină (reactiv 3) și piridină-acid clorhidric (reactiv 4), în proporție de 2 : 10. 6. Soluție standard stoc. Se barbotează clorcian (lipsit de clor) în acid acetic glacial aflat într-un balon cotat cîntărit. După recîntărire și completare la semn cu acid acetic glacial, se calculează conținutul de clorcian pe ml soluție. Soluția este stabilă timp de o lună. 7. Soluție standard de lucru. Într-un balon cotat se aduce un volum cunoscut de soluție standard stoc, astfel ca, prin diluare cu acid acetic glacial, să se obțină o concentrație de 1 ml = 5 μg. Soluția este stabilă cîteva ore.

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un microabsorbitor conținînd 3 ml alcool etilic, 1 ml acid acetic glacial și 1 ml amestec benzidină + piridină + acid clorhidric (reactiv 5). Se recoltează volume de aer astfel calculate, încît culoarea dezvoltată să corespundă la cantități de clorcian cuprinse între 1 și 5 μg/probă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, conținînd aceiași reactivi, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitorului prin care a trecut aerul și care s-a colorat în urma reacției cu clorcianul din aer, se transvazează în cuva de 1 cm cu capac și se măsoară extincția la spectrofotometru, la λ = 530 nm, în compensație cu lichidul din microabsorbitorul martor. Culoarea dezvoltată este stabilă 20 ore.

Curba de standardizare se întocmește între 1 și 5 μg ClCN, prin puncte din 1 în 1, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația ClCN, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg ClCN/m³ aer :

$$\text{mg ClCN/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația ClCN, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Prepararea standardului din clorcian este dificilă, deoarece reclamă o instalație specială pentru producerea, purificarea și barbotarea clorcianului în balonul cotat cu acid acetic glacial, în plus, manipularea toxicului prezintă pericol de intoxicare. Pentru evitarea acestor neajusnuri se înlocuiește clorcianul cu bromcian, care reacționează în mod similar cu nucleul piridinic. Fiind substanță solidă, bromcianul poate fi cîntărit direct, fără instalație specială. Deschiderea recipientului se execută respectînd măsurile obligatorii

Scanned with OKEN Scanner

la manipularea substanțelor iritante. Pentru transformarea stoechiometrică, se folosește corespondența 1 mg ClCN = 1,72 mg BrCN. 2. Dizolvarea benzidinei-bază în acid clorhidric nu asigură întotdeauna aceeași concentrație de clorhidrat de benzidină. De aceea se utilizează benzidină clorhidrică ca atare, din care se prepară o soluție apoasă 1%, ca la dozarea acidului cianhidric.

5. *Metoda spectrofotometrică pentru clorura de cianuril (tehnica Cotrău și colaboratorii)*

Principiu

Clorura de cianuril, $(ClCN)_2$, reacționează cu piridina și cu acidul barbituric în mediu apos, formîndu-se un compus roșu-violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 0,25 μg/8 ml.

Reactivi

1. Soluția absorbantă: acetonă p.a. 2. Piridină p.a. 3. Acid barbituric 1%. Se dizolvă 1 g acid barbituric într-un amestec de 10 ml soluție hidroxid de sodiu 0,5 N și 40 ml apă distilată, apoi se completează la 100 ml cu apă distilată. Soluția se poate păstra în laborator timp de două săptămîni fără a cristaliza. 4. Soluție standard stoc. Se aduc 0,1000 g clorură de cianuril într-un balon cotat de 100 ml, utilizînd 20 ml acetonă, apoi se completează la semn cu acetonă. În lipsa clorurii de cianuril p.a. se poate utiliza și substanța tehnică, după purificare prin recristalizare din acetonă la cald. Soluția poate fi păstrată la temperatura laboratorului timp de o săptămînă (1 ml = 1 mg $(ClCN)_2$. 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu acetonă în proporție de 1 : 100 [1 ml = 10 μg $(ClCN)_2$].

Recoltarea probelor

Se aspiră 5 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă. Pentru evitarea evaporării acetonei, microabsorbitoarele se mențin în gheață.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește, prin transvazare, într-o eprubetă gradată cu dop rodat și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare, se iau 3 ml soluție, se adaugă 1 ml piridină și 1 ml soluție acid barbituric. Eprubetele se închid cu dopul rodat și se lasă în repaus 15 minute, apoi se adaugă 3 ml apă distilată.

În mod similar se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru, la $\lambda = 600$ nm, în cuva de 1 cm cu capac, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 0,25 și 2 μg $(ClCN)_2$, prin puncte din 0,25 în 0,25, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația C a $(ClCN)_2$, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg $(ClCN)_2/m^3$ aer :

$$\text{mg } (CLCN)_2/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația (ClCN), în μg ;
V = volumul de aer recoltat în litri.

6. *Metoda spectrofotometrică pentru dibenzdiizocianat (DBDI)*

Principiu

Dibenzdiizocianatul, DBDI, $O=C=N-C_6H_4-(CH_2)_2-C_6H_4-N=C=O$, trece, prin hidroliză în mediu acid, în dibenzildiamină, care prin diazotare și cuplare cu N-naftiletilendiamină (NED), formează un compus violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 10 μg/7 ml.

Reactivi

1. Soluție absorbantă. Se aduc la 1 000 ml cu apă distilată, 36 ml acid clorhidric concentrat (reactiv 2) și 24 ml acid acetic glacial (reactiv 3). Soluția este de aproximativ 0,8 N. 2. Acid clorhidric d = 1,19. 3. Acid acetic glacial. 4. Soluție de diazotare. Se dizolvă în 100 ml apă distilată, 2,5 g bromură de sodiu sau de potasiu și 1,5 g azotit de sodiu. Bromura facilitează diazotarea. Soluția se poate păstra la rece o săptămînă. 5. Sulfamat de amoniu 10%. Soluția se poate păstra la rece o săptămînă. 6. Soluția de cuplare. Se dizolvă 0,025 g naftil-etilendiamină în 25 ml apă distilată, se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat și se completează la 50 ml cu apă distilată. Soluția se poate păstra la rece o săptămînă. 7. Soluția standard stoc. Se aduc într-un balon cotat de 25 ml, 0,0500 g dibenzdiizocianat și se completează la semn cu acid acetic glacial (1 ml = 2 mg DBDI). 8. Soluție standard de lucru. Într-un balon cotat de 100 ml se introduc : 1,5 ml acid acetic glacial, 3,5 ml acid clorhidric concentrat și 1,0 ml soluție standard stoc, apoi se completează la semn cu apă distilată (1 ml = 20 μg DBDI).

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 100 litri aer, cu un debit de 2,5—3 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținînd cîte 5 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu cîte 5 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul microabsorbitoarelor se reunește prin transvazare într-o eprubetă gradată și se completează la 10 ml cu soluție absorbantă. Pentru dozare se iau 5 ml soluție, se adaugă 0,5 ml soluție de diazotare și se lasă 15 minute. ASe adaugă 0,5 ml soluție de sulfamat, se lasă în repaus 10 minute, apoi se adaugă 1 ml soluție de cuplare. După fiecare adaos de reactiv, se agită conținutul eprubetei.

În mod similar, se prelucrează și probele martor.

Se măsoară extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se întocmește între 10 și 100 μg DBDI, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținîndu-se concentrația C, a DBDI, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DBDI/m³ aer :

$$\text{mg DBDI/m}^3\text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația DBDI, în μg ;

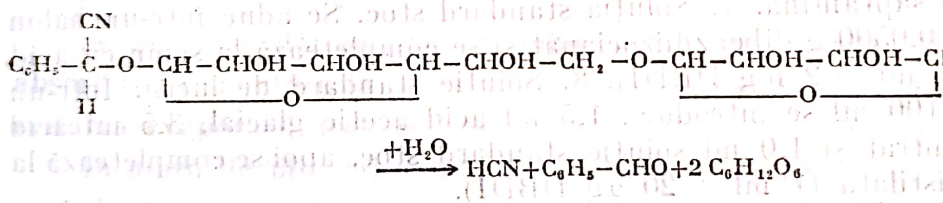
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Se recomandă ca soluția etalon de DBDI să fie preparată cu produsul cel mai nou al întreprinderii unde se analizează aerul și în timpul cel mai scurt, din cauza stabilității relative a produsului, ca și a soluțiilor etalon.

D. **Dozarea HCN din glicozizi**

Migdalele amare și alți sîmburi de prunacee și lauracee conțin un glicozid cian genetic și o enzimă hidrosolubilă cu acțiune hidrolizantă (emulsina), fiecare aflîndu-se în celule diferite. Omogenizînd prin triturare și adăugînd apă, emulsia vine în contact cu glicozidul, hidrolizîndu-l cu formare de acid cianhidric, aldehidă benzoică și glucoză :



Hidroliza poate fi realizată și prin tratare cu acizi diluați. Se procedează astfel : produsul măcinat și suspendat în apă se introduce într-un flacon cu dop rodat. Pentru a accelera hidroliza, flaconul se menține la 37°C. După 4—24 ore (la terminarea hidrolizei) conținutul flaconului se tratează cu 10 ml acid clorhidric concentrat și se distilă, culegînd acidul cianhidric într-o soluție slab alcalină, în care se dozează după metoda descrisă.

E. **Dozare din produse biologice**

1. *Metoda spectrofotometrică pentru sulfocianuri*

Principiu

Dozarea sulfocianurilor se bazează pe formarea compusului $Fe(SCN)_3$ (v. reacția Liebig).

Reactivi

1. Acid tricloracetic 10%. 2. Nitrat feric 5%. Se dizolvă 12,5 g nitrat feric în 250 ml acid azotic 1 N. 3. Nitrat mercuric, soluție saturată. 4. Soluție standard stoc. Se prepară o soluție de sulfocianură de potasiu 0,1% (aproxi-

mativ 1 ml = 1 mg). 5. Soluție standard de lucru. Se titrează soluția standard stoc cu azotat de argint 0,1 N și se calculează concentrația exactă de KSCN. Se diluează cu apă, astfel ca să se obțină o soluție din care 1 ml = = 25 μg KSCN. Se prepară extemporaneu din soluția standard stoc, care se titrează în aceeași zi.

Recoltarea probelor

Se recoltează sînge din puncție venoasă. Se colectează urină într-un recipient curat. Este indicat să se cerceteze sulfocianurile în ser și urină cît mai curînd după expunerea probabilă — pînă în 24 ore.

Modul de lucru

Se pipetează 2 ml ser și se adaugă 2 ml acid tricloracetic. Se amestecă și după 10 minute se filtrează. Se pipetează 5 ml urină și se adaugă 5 ml acid tricloracetic. După 5 minute se filtrează.

La 2 ml filtrat (corespunzînd la 1 ml ser sau 1 ml urină) se adaugă 3 ml nitrat feric și se amestecă. În paralel se face un martor al reactivului, cu 2 ml apă și 3 ml nitrat feric. După 10 minute se citește extincția probelor, la spectrofotometru, la $\lambda = 470$ nm, în cuva de 1 cm, față de martorul reactivului (Ep). Se repetă citirea extincției după adăugarea a 1—2 picături de nitrat mercuric (Eo).

Curba de standardizare se întocmește între 10 și 50 μg KSCN prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute se calculează factorul de pantă (A).

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg KSCN/100 ml ser sau mg KSCN/litru urină :

$$\text{mg KSCN/100 ml ser} = (Ep - Eo) \times A \times 0{,}1$$

$$\text{mg KSCN/1 000 ml urină} = (Ep - Eo) \times A$$

Observație

Subiectul examinat nu va lua medicamente conținînd salicilați cu cel puțin 48 ore înainte de determinare, întrucît aceștia dau aceeași colorație cu sarea ferică.

Interpretarea rezultatelor

Sulfocianurile sînt forma disimulată a HCN și apare prin metabolizarea acestuia sau în procesul de putrefacție. În mod fiziologic se formează sulfocianuri în organism, astfel încît la persoanele fără expunere la compuși ai cianului, se găsesc următoarele cantități :

— în ser, la nefumători, pînă la 2 mg sulfocianuri/100 ml și la fumători, pînă la 3 mg sulfocianuri/100 ml ;

— în urină, la nefumători, pînă la 2 mg sulfocianuri/litru și la fumători, pînă la 16 mg sulfocianuri/litru.

Se consideră ca indice de expunere la compuși ai cianului, nivele sanguine de peste 8 mg/100 ml și eliminări urinare de peste 30 mg/litru.

Scanned with OKEN Scanner

Cînd se urmărește CN^- în produse cadaverice, este necesară transformarea KSCN în HCN prin oxidare cu acid cromic și separare prin distilare a HCN (metoda Chelle).

Concentrațiile maxime admise de substanțe toxice în atmosfera zonei de muncă, conform Normelor republicane R.S.R. din 1975, sînt prezentate în *anexa 2*.

II.5. DETERMINAREA UNOR ALCALOIZI

II.5.1. REACTIVII GENERALI AI ALCALOIZILOR

Identificarea alcaloizilor se realizează, într-o primă etapă, cu ajutorul reactivilor generali de precipitare și de culoare. Sînt utilizate, de asemenea, reacția Vitali și reacția Prudhomme.

Reacția de identificare a alcaloizilor cu *reactivii generali de precipitare* se execută pe o soluție de clorhidrat sau sulfat de alcaloid, în modul următor: reziduul rămas pe sticla de ceas după evaporarea solventului, este reluat cu cîteva picături de acid clorhidric diluat sau acid sulfuric diluat și evaporat la sec pe baia de apă. Reziduul, care reprezintă alcaloidul salifiat, este dizolvat în 3—4 picături de reactiv general de precipitare, cînd în prezența alcaloizilor, pot să apară: o opalescență, un precipitat sau zone colorate.

Principalii reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor sînt următorii:

1. *Reactivul Bouchardat, iod iodurat, KI, I_2.* Se dizolvă 2 g iodură de potasiu în cîțiva mililitri de apă, se adaugă 2 g iod și, după dizolvare, se aduce la 100 ml cu apă. *Reactivul Wagner* este o variantă a reactivului Bouchardat și conține 6 g IK și 2 g iod la 100 ml apă.

Reactivii Bouchardat și Wagner formează cu alcaloizii precipitate roșii, brune-roșii sau brune, solubile în alcool și în iodură de potasiu 10—20%.

2. *Reactivul Dragendorff, iodobismutat de potasiu,* $K[BiI_4]$. Se suspendă 5 g carbonat de bismut în 50 ml apă, se adaugă 10 ml HCl concentrat și 25 g IK dizolvate în 40 ml apă. Iodura de bismut formată, BiI_3, neagră-brună, se dizolvă în excesul de KI, dînd o soluție portocalie-roșie.

Reactivul Dragendorff formează cu alcaloizii precipitate roșii amorfe, solubile în alcool, eter, alți solvenți organici.

3. *Reactivul Marmé, iodocadmiat de potasiu,* $K_2[CdI_4]$. Se dizolvă 5 g iodură de cadmiu într-o soluție caldă de 10 g iodură de potasiu în 30 ml apă și se aduce la 100 ml cu apă.

Reactivul Marmé formează cu alcaloizii precipitate albe sau alb-gălbui, solubile în exces de reactiv.

4. *Reactivul Mayer, iodomercurat de potasiu,* $K_2[HgI_4]$. La 20 ml soluție de iodură de potasiu 5% se adaugă 50 ml soluție fierbinte de clorură mercurică 10%, se răcește, se filtrează și se aduce la 100 ml cu apă.

Reactivul Mayer formează cu alcaloizii precipitate albe sau alb-gălbui, cristaline sau amorfe.

Scanned with OKEN Scanner

5. *Reactivul Waltzer, iodomercurat de potasiu.* La o soluție de iodură de potasiu 10% se adaugă iodură mercurică solidă, pînă la saturare. Reactivul Waltzer este mai sensibil decît reactivul Mayer, deoarece nu conține iodură de potasiu liberă.

6. *Clorura aurică, 5%, 10%, 30%, 40%.* Formează cu alcaloizii precipitate de cloroaurați de alcaloizi, albe sau galbene.

7. *Clorura mercurică, soluție 5%.* Formează cu alcaloizii precipitate albe de cloromercurați de alcaloizi.

8. *Clorura de platină, soluție 5%.* Formează cu alcaloizii precipitate de cloroplatinați de alcaloizi.

9. *Sarea Reinecke, sarea de amoniu a acidului cromdiaminotetracian* $[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]NH_4 \cdot H_2O$, *soluție 4%.* Formează cu alcaloizii, în soluție slab clorhidrică, precipitate roz.

10. *Reactivul Bertrand, acid silicowolframic, soluție 5%.* Formează cu alcaloizii precipitate albe; din complex alcaloidul poate fi eliberat prin tratare cu hidroxizi și extras cu solvenți organici. Este un reactiv sensibil.

11. *Reactivul Scheibler.* Se dizolvă 20 g wolframat de sodiu în 90 ml apă, se adaugă 10 ml acid fosforic d = 1,13 și se fierbe 10 minute. După răcire, se filtrează și se adaugă 10 ml HCl concentrat.

Reactivul Scheibler formează cu alcaloizii precipitate albe sau galbene.

12. *Reactivul Schultze.* Se dizolvă 3 g clorură de stibiu și 9 g fosfat acid de sodiu în 100 ml apă.

Reactivul Schultze formează cu alcaloizii precipitate albe.

13. *Reactivul Sonnenschein.* Se dizolvă 10 g fosfomolibdat de amoniu în 10—20 ml apă, se adaugă 0,50 ml acid azotic concentrat și se aduce la 100 ml cu apă.

Reactivul Sonnenschein formează cu alcaloizii precipitate galbene sau portocalii; de asemenea, cu unele amine și cu glicozii cardiotonici. Reactivul este redus de substanțele reducătoare.

14. *Reactivul Hager, acid picric soluție 1%.* Formează cu alcaloizii precipitate galbene solubile la cald, care reprecipită la răcire. Unele precipitate au forme caracteristice. Următoarea variantă, propusă de Ionescu Matiu, favorizează obținerea cristalelor caracteristice: la soluția saturată de acid picric în alcool de 95°, se adaugă glicerină în proporție de 5%.

15. *Acid tanic, soluție 5%.* Formează precipitate cu alcaloizii și cu substanțele proteice.

16. *Reactivul Knorr, acid picrolonic (p-nitrofenil-3-metil-4-nitro-5-pirazolonă) soluție 2% în alcool.* Formează cu alcaloizii precipitate galbene sau roșii, care se descompun la cald.

Test rapid pentru identificarea alcaloizilor în urină. Peste 2 ml urină se adaugă 5—10 picături de reactiv Key-Kaye. O turbiditate imediată care apare la agitare, denotă prezența albuminei sau a alcaloizilor. Se încălzește ușor eprubeta. Dacă turbiditatea se datorează albuminei, precipitatul se intensifică și persistă prin încălzire. Dacă precipitatul se dizolvă complet prin încălzire și reapare la răcire, turbiditatea se datorează alcaloizilor.

Reactivul Key-Kaye: 3 g clorură mercurică, 2 g iodură de potasiu, 20 ml acid acetic glacial, apă distilată q.s. ad 100 ml.

Reacțiile de precipitare ale alcaloizilor cu principalii reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor sînt prezentate în tabelul 5.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Reacții de precipitare ale alcaloizilor (după Banciu)

Alcaloidul	*Reactiv Hager*	*Reactiv Mayer*	*Reactiv Dragendorff*	*Reactiv Bouchardat*
Aconitina	precipită numai în soluții concentrate	precipitat alb în soluții diluate	precipitat galben (1 : 40 000) (+)	precipitat brun
Atropina	precipitat galben numai în soluții concentrate (1 : 200)	(1 : 7 000)	galben-roșcat, trece în galben intens (1 : 10 000)	brun-roșcat (1 : 3 000)
Cafeina	precipită numai în soluții concentrate	nu precipită	nu precipită	precipitat brun numai în soluții concentrate
Chinina	precipitat amorf (1 : 40 000)	precipitat alb (1 : 125 000)	precipitat roșu (1 : 50 000)	roșu-brun
Cocaina	precipitat galben (1 : 1 000)	(1 : 140 000)	—	precipitat brun (1 : 50 000)
Codeina	precipitat galben (1 : 225)	(1 : 50 000)	precipitat roșu (1 : 30 000)	precipitat brun (1 : 60 000)
Colchicina	precipită numai în soluții concentrate	precipită numai în soluții concentrate	(1 : 3 000)	precipitat brun (1 : 2 500)
Coniina	precipită numai în soluții concentrate	precipitat alb (1 : 8 000)	precipitat galben (1 : 6 000)	precipitat brun
Fizostigmina	precipită numai în soluții concentrate	precipitat alb (1 : 5 000)	precipită	precipitat brun-roșcat (1 : 25 000)
Morfina	nu precipită	(1 : 2 500)	roșu-galben (1 : 5 000)	brun-roșcat (1 : 25 000)
Nicotina	precipitat galben numai în soluții concentrate	precipitat alb (1 : 2 500)	precipitat roșu, trece în alb-cenușiu (1 : 40 000)	precipitat brun-roșcat (1 : 50 000)
Papaverina	precipitat galben (1 : 500)	precipitat alb (1 : 1 000)	precipitat roșu-portocaliu (1 : 10 000)	precipitat roșu-închis (1 : 50 000)
Pilocarpina	precipită	precipită	precipită	precipită
Strichnina	precipitat galben (1 : 20 000)	precipitat alb (1 : 15 000)	precipitat galben intens (1 : 250 000)	precipitat brun-roșcat (1 : 50 000)
Teobromina	nu precipită	nu precipită	—	precipită numai în soluții concentrate
Veratrina	(1 : 10 000)	precipitat alb-gălbui în soluții concentrate	precipitat galben în soluții concentrate	precipitat brun (1 : 15 000)
Yohimbina	precipitat galben	precipitat galben		—

(+) = cifrele din paranteză reprezintă gradul de sensibilitate a reacției.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția de identificare a alcaloizilor cu *reactivii generali de culoare* se execută, după stabilirea prezenței alcaloizilor cu ajutorul reactivilor generali de precipitare (pe alcaloizii nesalifiați). Reacțiile sînt cu atît mai nete, cu cît reziduul este mai purificat, deoarece majoritatea reactivilor generali de culoare conțin acid sulfuric concentrat ; acesta carbonizează impuritățile, astfel încît colorația reactiv-alcaloid este interferată sau chiar mascată.

Principalii reactivi generali de culoare ai alcaloizilor sînt următorii :

1. *Acidul sulfuric concentrat ;*
2. *Acidul azotic concentrat ;*
3. *Reactivul Erdman :* 1 ml acid azotic concentrat, 80 ml acid sulfuric concentrat, 20 ml apă ;
4. *Reactivul Fröhde (sulfomolibdat de amoniu) :* 0,1—1 g molibdat de amoniu, 100 ml acid sulfuric concentrat ;
5. *Reactivul Mandelin (sulfovanadat de amoniu) :* 1 g vanadat de amoniu, 100 ml acid sulfuric concentrat ;
6. *Reactivul Lafon (sulfoselenit de amoniu) :* 5 g selenit de amoniu, 100 ml acid sulfuric concentrat ;
7. *Reactivul Mecke (sulfoselenit de sodiu) :* 0,5 g selenit de sodiu, 100 ml acid sulfuric concentrat ;
8. *Reactivul Marquis (sulfoformolat) :* 1 ml formol 40%, 30 ml acid sulfuric concentrat (se prepară extemporaneu) ;
9. *Reactivul Wasicki :* 2 g p. dimetilaminobenzaldehidă, 6 ml acid sulfuric concentrat, 0,4 ml apă distilată.

Reacția Vitali : reziduul de la evaporarea solventului organic se tratează cu cîteva picături acid azotic fumans și se observă culoarea (A). Se evaporă la sec pe baia de apă și se observă culoarea (B). Reziduul este umectat cu o soluție alcoolică de hidroxid de sodiu 2% proaspăt preparată și se observă culoarea (C). Culorile dezvoltate în fiecare din cele trei etape se notează A/B/C, de exemplu : galben/galben/violet, iar absența culorii într-una din etape este marcată prin semnul —, de exeplu, —/ —/ violet.

Metoda Prudhomme. În 1940 Prudhomme a imaginat metoda de cercetare a chininei în produse biologice prin complexarea acesteia cu eozină și extragerea complexului alcaloid-colorant cu cloroform. Ulterior metoda a fost extinsă la majoritatea alcaloizilor și a medicamentelor cu caracter bazic, ca și la compușii cuaternari de amoniu, folosidu-se coloranți ca albastru de bromtimol, albastru de bromfenol, halogenuri de bromsulfonftaleină, metilorgane etc. și diferiți solvenți pentru extragere. Metoda este sensibilă dar neselectivă, dezavantaj remediat prin utilizarea solvenților și a *p*H-ului adecvați.

În continuare se prezintă schema cercetării alcaloizilor și a altor substanțe organice nevolatile, cu ajutorul reactivilor generali ai alcaloizilor (schema 3).

Cercetarea alcaloizilor și a altor substanțe organice nevolatile (după Douris)

A. Toxici extractibili din mediul acid

I. *Reziduul se dizolvă în 0,5 ml HCl 5% și se tratează soluția cu o picătură reactiv Dragendorff:*

1. Apare un precipitat portocaliu
   a) Soluția inițială precipită cu r. Mayer-Waltzer:
      — reziduul + 2 pic. HNO_2 → culoare violetă + KOH, culoare portocalie . . . . . Colchicină
      — pe reziduu se execută reacția Labat → culoarea verde . . . . . Narcotină
      — reziduul tratat cu H_2SO_4 → culoare galbenă + apă de brom → culoare violetă . . . . . Veratrină
   b) Soluția inițială nu precipită cu r. Mayer-Waltzer:
      — se execută reacția murexidului . . . . . Metilxantin
2. Nu apare precipitat cu r. Dragendorff:
   a) Se execută reacția Parri:
      — culoare violetă . . . . . Barbiturici
      — culoare purpurie deschis . . . . . Glutetimidă
   b) Se execută reacția cu $FeCl_3$:
      — culoare roșie . . . . . Acid meconic, Fenazonă
      — culoare violetă . . . . . Acid salicilic
      — culoare albastră . . . . . Fenol
      — precipitat gălbui . . . . . Acid benzoic

II. *Reziduul se tratează cu H_2SO_4:*

1. Culoare violetă, dispare la adaos de apă . . . . . Loganozid
2. Culoare albastră fugace . . . . . Crocozid
3. Culoare brună . . . . . Glicozizi cardiotonici
4. Degajă bule la încălzire . . . . . Acid oxalic
5. Apare culoare violacee la adaos de dicromat de potasiu (atenție la stricnină) . . . . . Acetanilidă
6. Culoare galbenă; la adaos de apă de brom → culoare violetă . . Veratrină
7. Culoare galben închis; la adaos de dicromat de potasiu → culoare roșie-violetă . . . . . Picrotoxină
8. Culoare verde . . . . . (posibil) Apomorfină
9. Reziduul este galben; la adaos de H_2SO_4 → culoare verde . . . Berberină

B. Toxici extractivili din mediul alcalin (alcalinizare cu $NaHCO_3$)

Extracția cu eter etilic

Reziduul poate fi lichid sau solid

I. *Reziduul este lichid:*

Reziduul exală la încălzire miros neplăcut. Se încearcă reacția la turnesol. Se reia reziduul cu 1 ml HCl 5%, se evaporă și se obține clorhidratul corespunzător.

1. Reziduu bazic la turnesol, cu miros de șoarece . . . . . Coniină
2. Reziduu neutru la turnesol; clorhidratul este cristalin. Se adaugă o picătură de acid cromic:
   a) Culoare albastră-închis . . . . . Anilină
   b) Apare miros de tutun . . . . . Nicotină
3. Reziduul tratat cu 2 pic. H_2SO_4 10% și, după dizolvarea, cu o picătură HNO_3:
   a) Incolor . . . . . Anilină
   b) Culoare roșie . . . . . Nicotină, Coniină

4. Reziduul tratat cu 1 ml $AgNO_3$ 10 %
   a) Reducere rapidă a $AgNO_3$ . . . . . Coniină
   b) Reducere lentă a $AgNO_3$ . . . . . Nicotină
   c) Nu se reduce $AgNO_3$; formare de cristale sau precipitat alb, solubil la cald și depus la rece . . . . . Anilină
5. Se execută reacția Roussin . . . . . Nicotină

II. *Reziduul este solid :*

Reziduul se tratează cu cîteva picături de HNO_3 :

1. Apare culoare la rece :
   a) Culoare violet închis . . . . . Colchicină
   b) Culoare roșie persistentă . . . . . Apomorfină
   c) Culoare roșie → portocalie → galbenă ; se adaugă 2 pic. $SnCl_2$:
      — culoarea trece în violet-ametist . . . . . Brucină
      — culoarea nu se modifică . . . . . Morfină
2. Fără coloraţie netă (galbenă sau galben-verzuie) ; evaporare pe baia de apă :
   a) Culoarea trece în albastru-verde . . . . . Heroină
   b) Culoarea rămîne galbenă ; la saturare cu KOH → galben-auriu . Ptomaine
3. Culoare verde-purpuriu . . . . . Fenazonă
4. Culoare roșie, cu NH_4OH, verde . . . . . Ezerină
5. Fără culoare ; se oxidează cu HNO_3 de două ori, apoi se adaugă 2 picături KOH soluţie alcoolică 10 % :
   a) Culoare violetă intensă . . . . . Alcaloizi din Solanee
   b) Fără culoare, dezvoltă miros de mentă . . . . . Stricnină

III. *Reziduul tratat cu 3 picături de H_2SO_4 concentrat :*

1. Soluţie incoloră :
   a) La încălzire ușoară, miros de flori de prun . . . . . Atropină
   b) Ușoară fluorescenţă ; reacţia taleochininei este pozitivă . . . Chinină
   c) Reactiv Mandelin, 2 picături ; culoare violetă + apă → culoare roz . . . . . Strichnină

IV. *Reziduul tratat cu reactiv Fröhde :*

1. Culoare violetă → verde → verde-brună → galbenă . . . . . Morfină
2. Culoare verde → verde-brună → galbenă → roșie . . . . . Narcotină
3. Culoare roșie → verde . . . . . Emetină

V. *Reziduul tratat cu reactiv Lafon :*

1. Culoare verde-smarald (reacţie negativă cu $FeCl_3$, HIO_3, $K_3[Fe(CN)_6]$ . . . . . Codeină
2. Culoare verde . . . . . Morfină

VI. *Reziduul tratat cu reactiv Wasicki :*

1. Culoare roșie deschis . . . . . Morfină
2. Culoare verde intens, fugace ; prin încălzire → brun-sepia . . . Veratrină
3. Culoare verde deschis, la încălzire . . . . . Ezerină
4. Fără culoare (chiar după 24 ore) ; la încălzire, culoare portocalie → roșie → roșie-violet . . . . . Alcaloizi din Solanee

C. Toxici extractibili din mediul alcalin

Extracţia cu cloroform

Lichidul alcalin, după epuizare cu eter, se acidulează cu HCl și se realcalinizează cu NH_2OH, apoi se extrage cu $CHCl_3$

I. *Reziduul tratat cu reactiv Mandelin :*
1. Culoare violetă ; la adaos de apă → roz . . . . . Stricnină
2. Culoare galbenă-portocalie → violet-roşu . . . . . Veratrină
3. Culoare verde . . . . . Fenazonă

II. *Reziduul tratat cu reactiv Marquis :*

1. Culoare purpurie . . . . . Morfină

III. *Reziduul tratat cu reactiv Fröhde :*

1. Culoare galbenă-verzuie → verde . . . . . Emetină
2. Culoare albastră-violetă → albastră → violetă . . . . . Morfină
3. Culoare verde-brună → brună → roşu viu . . . . . Narceină

IV. *Soluţia cloroformică era roşie sau violetă ;*

reziduul este verde ; la adaos de eter, acesta se colorează în roşu-purpuriu . . . . . Apomorfină

D. Toxici extractibili din mediul alcalin (alcalinizare cu amoniac)

I. *Reziduul tratat cu $FeCl_3$:*
1. Culoare albăstruie ; la adaos de fericianură → albastru . . . . Morfină
2. Fără culoare, după adaos de fericianură . . . . . Ptomaine

II. *Reziduul tratat cu reactiv Fröhde :*

1. Culoare violetă-deschis → violet-albastru . . . . . Morfină
2. Culoare verde-brună → verde → roşu-viu . . . . . Narceină

III. *Reziduul tratat cu reactiv Marquis :*

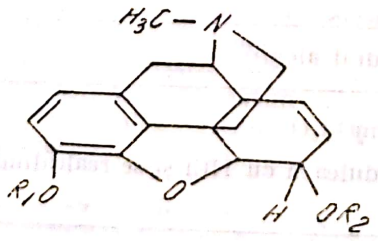
1. Culoare purpurie . . . . . Morfină

IV. *Reziduul tratat cu soluţie apoasă de iod :*

1. Culoare albastră (morfina interferă reacţia) . . . . . Narceină

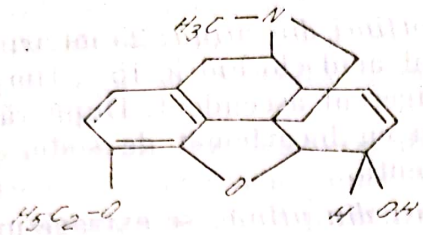
II.5.2. MORFINA, CODEINA, TEBAINA, DERIVAŢI DE SEMISINTEZĂ ŞI SINTEZĂ

— *Alcaloizi naturali din opiu :* morfina, codeina, tebaina :

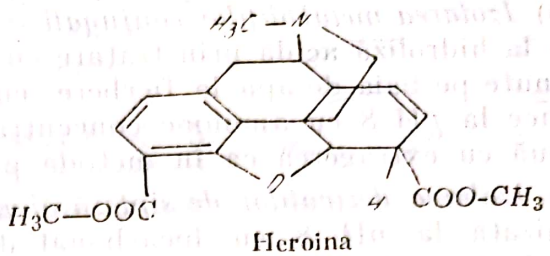


	R_1	R_2
Morfina	H	H
Codeina	CH_3	H
Tebaina	CH_3	CH_3

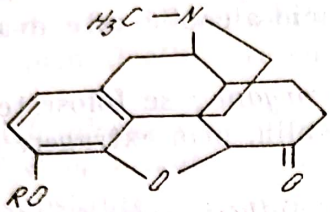
— *Derivați de semisinteză:* dionina, heroina, hidromorfona, hidrocodona, nalorfina:



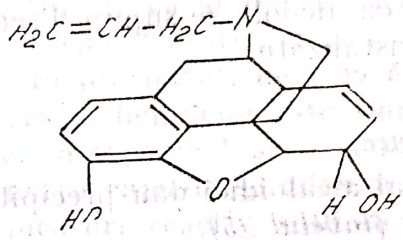
Dionina



Heroina

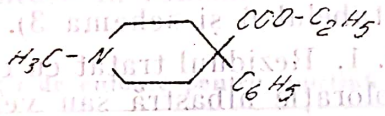


	R
Hidromorfona	H
Hidrocodona	CH_3

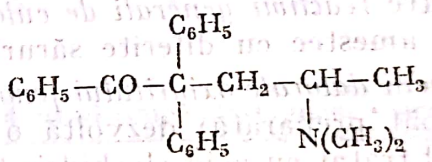


Nalorfina

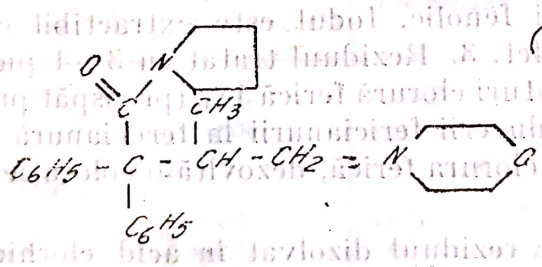
— *Derivați de sinteză:* petidina, metadona, dextromoramida, pentazocina:



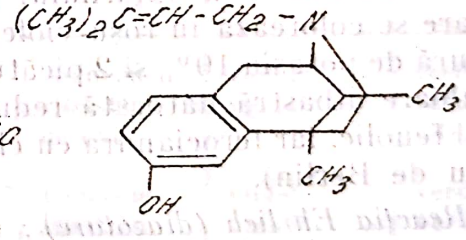
Petidina



Metadona



Dextromoramida



Pentazocina

A. Izolare

a. *Izolarea morfinei din urină:* se alcalinizează 25 ml urină la *p*H 8 cu amoniac 1 : 1 sau cu bicarbonat de sodiu și se extrag de 2—3 ori cu cîte 25 ml cloroform, diclormetan sau amestec cloroform-etanol (9 : 1). Alcalinizarea se face în timpul agitării cu solventul, pentru ca morfina bază să fie extrasă direct în forma amorfă de către solvent. În caz contrar, forma amorfă trece în forma cristalină, greu solubilizată de solvent. De asemenea, nu se utilizează, pentru alcalinizare, hidroxizi de sodiu sau potasiu, deoarece se obțin fenolați (morfinați) hidrosolubili, deci neextractibili cu solvenți or-

ganici. Extractele organice reunite sînt filtrate și evaporate la sec pe baia de apă la temperatură sub 80°C.

b) *Izolarea metaboliților conjugați și a morfinei din urină:* 25 ml urină se supun la hidroliză acidă prin tratare cu 10 ml acid clorhidric 15% timp de 30 minute pe baia de apă la fierbere. cu refrigerent ascendent. După răcire, se aduce la *p*H 8 cu amoniac concentrat sau cu bicarbonat de sodiu și se continuă cu extragerea ca în metoda precedentă.

c) *Izolarea derivaților de sinteză ai morfinei din urină:* se extrage urina, alcalinizată la *p*H 8 cu bicarbonat de sodiu, cu amestec cloroform-eter (1 : 1). Extractul organic este evaporat la sec, apoi purificat cu o soluție de acid tartric în alcool foarte diluat. Lichidul acid-alcoolic este evaporat la sec, iar reziduul reluat cu cloroform.

d) *Izolarea morfinei și a derivaților săi din organe:* se folosește metoda Stat-Otto-Ogier, izolîndu-se din lichidul apos alcalin, prin extragere cu cloroform sau eter etilic.

e) *Izolarea morfinei și a derivaților săi din pulberi, comprimate, soluții:* se extrag produsele solide cu alcool; se supun direct reacțiilor de identificare lichidele și substanțele cristalizate.

B. *Identificare*

1. *Reacții de precipitare*

Morfina și derivații săi alcaloidici dau precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor (tabelul 5).*

2. *Reacții de culoare*

— *Morfina*

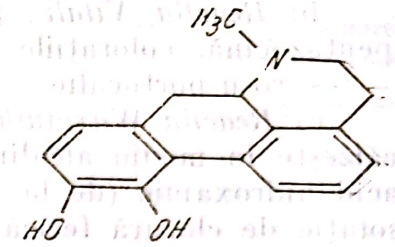
a) Dintre *reactivii generali de culoare ai alcaloizilor*, morfina dă colorații cu acizi în amestec cu diferite săruri (tabelul 6 și schema 3).

b) *Reacții datorate oxidrilului fenolic.* 1. Reziduul tratat cu clorură ferică 1% (proaspăt preparată) dezvoltă o colorație albastră sau verde-albastră. 2. Reziduul tratat cu acid clorhidric 0,1 N, apoi cu acid iodic 10%, prezintă o culoare galbenă, prin punerea în libertate a iodului din acidul iodic, prin acțiunea reducătoare a oxidrilului fenolic. Iodul este extractibil cu cloroform, care se colorează în roșu-violet. 3. Reziduul tratat cu 3—4 picături de fericianură de potasiu 10% și 2 picături clorură ferică 1% (proaspăt preparată) dă o culoare albastră datorată reducerii fericianurii la ferocianură de către oxidrilul fenolic, iar ferocianura cu clorura ferică, dezovltă o colorație albastră (albastru de Berlin).

c) *Reacția Ehrlich (diazotare):* reziduul dizolvat în acid clorhidric este tratat cu reactiv Ehrlich (5 ml soluție A și 3 picături soluție B). Se agită și se alcalinizează cu bicarbonat de sodiu cînd apare o culoare roșie, care prin acidulare trece în portocaliu. Reacția este negativă pentru derivații morfinei cu oxidrilul fenolic substituit. Reactivul Ehrlich se prepară din: soluția A, acid sulfanilic 0,5 g, acid clorhidric concentrat 5 ml, apă q.S. ad 100 ml; soluția B, nitrit de potasiu 0,5%.

d) *Reacția Denigès (reacția apomorfinei):* reziduul este încălzit pe baia de apă cu 5—6 picături de acid sulfuric concentrat, pînă la brunificare. Deshidratarea cu acid sulfuric duce la formarea apomorfinei. Se adaugă 3—4 ml

soluție saturată de acetat de sodiu, pentru a tampona aciditatea acidului sulfuric. Se transvazează într-o eprubetă și se adaugă 2 picături de clorură mercurică 5%. La încălzire pe baia de apă se dezvoltă o culoare verde sau verde-albastră.



e) *Reacția Danigès :* reziduul tratat cu 4—5 picături acid clorhidric concentrat, 2—3 picături apă oxigenată și 1—2 picături sulfat de cupru amoniacal, dă o culoare roșie intensă.

f) *Reacția cu nitrit de sodiu :* reziduul este dizolvat în 2 ml acid sulfuric 10% și tratat cu 0,1 ml nitrit de sodiu 10%, cînd se formează 2-nitrozomorfina, care prin alcalinizare cu amoniac, dezvoltă o culoare roșie, colorimetrabilă.

— *Alți alcaloizi morfinanici și derivați ai morfinei*

a) *Test de orientare :* reziduul de la evaporarea alcoolului (v. Izolare pt.e) și substanțele cristalizate sînt dizolvate în 2 ml acid clorhidric N. O porțiune din soluțiile obținute, ca și din probele de analizat lichide (de exemplu, soluții injectabile) sînt tratate cu reactiv Dragendorff pentru a constata dacă se formează un precipitat, deci dacă există o substanță alcaloidică. În caz afirmativ, restul lichidelor este împărțit în cinci porțiuni și evaporat la sec., în capsule. În capsula 1 se execută reacția Denigès (reacția apomorfinei). În celelalte patru capsule se adaugă cîte 10 picături acid sulfuric concentrat, apoi 2 picături reactiv sulfomolibdenic (reactiv Fröhde) în capsula 2, o picătură soluție de clorură ferică 10% în capsula 3, 2 picături reactiv sulfoformolat (reactiv Marquis) în capsula 4 și 2 picături reactiv sulfoselenit (reactiv Lafon) în capsula 5. Se compară colorațiile apărute cu acelea prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6

Reacții de culoare pentru morfină și derivați (după Castagnou, Clarke)

Derivatul	*Reacția apomorfinei (Denigès)* (1)	*Reactiv Fröhde* (2)	*Reacția cu* H_2SO_4 + $FeCl_3$ (3)	*Reactiv Marquis* (4)	*Reactiv Lafon* (5)
Morfina	verde	violet	violaceu	violet	verde
Codeina	verde	verde	albastru deschis	violet	verde-intens
Pantopon (Hexapon)	verd :	violet	violaceu	violet	verde
Heroina	verde	violet	albastru	violet	verde
Hidromorfona		violet → verde		galben → vișiniu	
Hidrocodona		verde → albastru		galben → vișiniu	
Nalorfina	verde	violet → verde		violet	albastru (incert)
Petidina	0	0	0	roșu-portocaliu	0
Metadona	0	0	0	roșu verde-oliv	0
Pentazocina		albastru			

b) *Reacția Vitali:* pentru morfină, codeină, hidromorfonă, nalorfină, pentazocină, colorațiile sînt galben/galben/portocaliu, pentru hidrocodonă, —/—/roșu-portocaliu.

c) *Reacția Waxmuth (pentru heroină):* soluția apoasă de heroină se încălzește în mediu alcalin cu clorhidrat de hidroxilamină, cînd se formează acid hidroxamic (de la radicalul acetil). După neutralizare, se tratează cu soluție de clorură ferică 1%, cînd apare o culoare roz-violacee, colorimetrabilă.

3. *Diferențierea intoxicației cu morfină de intoxicația cu preparate de opiu*

Diferențierea se realizează prin identificarea acidului mecanic, prezent în opiu în concentrație de 5—10%. Acidul meconic este extras prin metoda Stas-Otto-Ogier în mediu acid cu eter. Pentru purificare, reziduul de la evaporarea eterului acid este reluat cu apă și epuizat de cîteva ori cu benzen, în care acidul meconic este insolubil. Se separă, prin centrifugare, cele două faze. Reziduul fazei apoase (care conține acidul meconic) este reluat cu eter, extrăgîndu-se astfel acidul meconic. Soluția eterică, tratată cu cîteva picături de soluție de clorură ferică, dă o culoare roșie, propagată progresiv în faza apoasă. Culoarea este stabilă în timp și în prezența acidului clorhidric, ceea ce diferențiază acidul meconic de sulfocianuri și acetați.

Diferențierea între cele două tipuri de intoxicație se poate realiza și prin identificarea noscapinei, prezentă în opiu în concentrație de 5%.

4. *Cromatografie în strat subțire (C.S.S.)*

Utilizînd sistemele A, B, C, D (tabelul 7) se obțin următoarele Rf pentru alcaloizi, inclusiv pentru morfină și derivații săi (tabelul 8).

Tabelul 7

Caracteristici ale C.S.S. pentru alcaloizi (după Clarke)

<table>
<tr><th rowspan="2">Operația</th><th colspan="4">Sistemul</th></tr>
<tr><th>A</th><th>B</th><th>C</th><th>D</th></tr>
<tr><td>Pregătirea cromatoplăcilor</td><td colspan="3">plăci de sticlă 20×20. Silicagel G, 30 g în/60 ml apă, în strat de 0,25 mm</td><td>plăci de sticlă 20×20. Silicagel G, 30 g în 60 ml NaOH 0,1 N, în strat de 0,25 mm</td></tr>
<tr><td>Activare</td><td colspan="3">60 minute la 110°C</td><td>30 min. la 110°C</td></tr>
<tr><td>Spotare</td><td>1,0 µl din soluția 1% în acid acetic 2 N</td><td colspan="2">1—5 µl (1—25 µg) din extract dizolvat în 25—100 ml metanol</td><td>1,0 µl din soluția 1% în acid cacetic 2 N</td></tr>
<tr><td>Sistem de migrare</td><td>amoniac conc. metanol (1,5 : 100)</td><td>amoniac conc.: benzen : dioxan : etanol (5 : 50 : 40 : 5)</td><td>acid acetic glac. : etanol : apă (30 : 60 : 10)</td><td>cloroform : metanol (9 : 1)</td></tr>
</table>

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7 (continuare)

Operația	*Sistemul*			
	A	*B*	*C*	*D*
Timp de migrare	30 min	pînă la 10 cm de linia de spotare		10 min
Revelare prin : — pulverizare cu reactivi — examinare în U.V.	reactivii 1, 2, 3, 4	reactivul 5	reactivul 5	U.V. spoturi albastre
Reactivii	*Reactiv 1, iodoplatinat acidulat :* la 100 ml iodoplatinat (reactiv 5) se adaugă 2 ml HCl ; *Reactiv 2, permanganat de potasiu :* se dizolvă 1 g permanganat de potasiu în 100 ml apă. *Reactiv 3, vapori de iod :* se încălzesc cristale de iod într-o capsulă pe baia de apă și se expune cromatoplaca deasupra vaporilor ; *Reactiv 4, p. dimetilaminobenzaldehidă :* se dizolvă 1 g p. dimetilaminobenzaldehidă în 100 ml etanol și se adaugă 10 ml HCl ; *Reactiv 5, iodoplatinat :* se dizolvă 0,25 g clorură de platină și 5 g KI în 100 ml apă			

Tabelul 8

Valorile Rf pentru alcaloizi (după Clarke)

Compusul	*Sistemul*							
	A		*B*		*C*		*D*	
	Rf	*Reactiv*	*Rf*	*Reactiv*	*Rf*	*Reactiv*	*Rf*	*Reactiv*
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*
Morfina	0,34	1	0,11	5	0,27	5		
Codeina	0,35	1	0,39	5	0,29	5		
Tebaina	0,41	1						
Dionina	0,36	1	0,46	5	0,25	5		
Heroina	0,45	1	0,76	5	0,35	5		
Hidromorfona	0,24	1	0,17	5	0,21	5		
Hidrocodona	0,27	1	0,41	5	0,25	5		
Nalorfina	0,62	1	0,35	5	0,55	5		
Petidina	0,48	1	0,97	5	0,41	5		
Metadona	0,37	1	0,99	5	0,59	5		
Dextromoramida	0,70	1						
Pentazocina	0,60	1						
Papaverina	0,66	1						
Noscapina	0,62	1						
Narceina	0,33	1						
Chinina	0,52	* 1						
Chinidina	0,55	1						

* Revelare și prin examinare în lumina U.V. (254 nm), cînd apare fluorescență albastră.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Stricnina Brucina	0,22 0,12	1 1						
Rezerpină	0,77	2						
Fizostigmina Neostigmina (Br)	0,55 0,02	2 1						
Ergometrina Ergotamina Ergotoxina	0,67 0,68 0,73	4 4 4					0,19 0,51 0,78	* 4 * 4 * 4
Atropina Scopolamina Risociamina	0,18 — 0,18	1 — 1						
Cocaina	0,60	1						
Nicotina	0,57	1						
Coniina	0,26	1						
Pilocarpina	0,60	1						
Aconitina	0,71	1						
Colchicina	0,62	4						
Veratrina	0,61	3						

5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.* (v. tabelul 9).

Tabelul 9

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale morfinei și derivaților săi
(după Clarke)

Derivatul	*U.V. (maxime)*						*I.R. (în KBr)*		
	apă	*etanol*	*HCl 0,1 N*	*HCl 0,01 N*	*H_2SO_4 0,1 N*	*NaOH 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*
Morfina bază		287			284	250 296	805	1 243 1 448	945 1 118 1 475
Morfina HCl	285								
Codeina bază		286					1 052	1 268	1 500

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 9 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Heroina bază		281			279	278			
Hidromorfona					281				
Hidrocodona		280			280				
Nalorfina bază			273		285		1 505	1 466	1 121 1 155 1 304
Petidina bază		252 258 264							
Petidina HCl					251 252 257 563		1 708	1 216	1 166 1 160
Metadona bază					253 259 292 265				
Dextromoramida bază*				256 260 264					
Pentazocina			298			278			

* Identificarea prin spectrofotometrie în U.V. a dextromoramidei este sigură atunci cînd raportul densităților optice la trei lungimi de undă are următoarele valori:

$$d_{260}/d_{256} = 1{,}13 \text{ și } d_{260}/d_{264} = 1{,}26$$

Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică cu nitrit de sodiu*

Principiu

Morfina tratată cu nitrit de sodiu în meiu de acid sulfuric diluat sau acid clorhidric diluat formează 2-nitrozomorfina, galbenă, care, după alcalinizare cu amoniac, trece într-o coloraţie roşie, colorimetrabilă. Sensibilitatea reacţiei este de 5 μg/ml.

Reactivi

1. Acid sulfuric 10% ; 2. Nitrit de sodiu 10% ; 3. Amoniac concentrat ; 4. Soluţie standard : se dizolvă 0,0100 g morfină bază în 10 ml acid sulfuric 10% (1 ml = 1 mg morfină).

Modul de lucru

Reziduul de morfină de la extragerea cu cloroform în mediu alcalin este reluat cu 10 ml acid sulfuric 10% și adus într-o eprubetă gradată cu dop rodat. Din această soluție se iau 5 ml și se tratează cu 0,5 ml nitrit de sodiu 10%. După 5 minute se adaugă 2 ml amoniac.

Se măsoară extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 415$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curbura de etalonare se întocmește între 50 și 500 micrograme morfină prin puncte din 50 în 50, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din probă), obținîndu-se concentrația C a morfinei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg morfină/litru mediu biologic, de exemplu, urină:

$$\text{mg morfină/litru urină} = \frac{C}{A}$$

în care:

C = concentrația morfinei, în μg;

A = volumul de produs biologic (de exemplu, urină) luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică cu acid fosfomolibdenic*

Principiu

Morfina în mediu amoniacal reduce acidul fosfomolibdenic la molibdat de molibdenil (albastru de molibden), colorimetrabil. Sensibilitatea reacției este de 10 μ morfină/ml.

Reactivi

1. Acid sulfuric 10%; 2. Acid fosfomolibdenic 1% în alcool; 3. Amoniac concentrat; 4. Soluție standard: se dizolvă 0,0100 g morfină bază în 10 ml acid sulfuric 10% (1 ml = 1 mg morfină).

Modul de lucru

Reziduul de morfină de la extragerea cu cloroform în mediu alcalin este reluat cu 10 ml acid sulfuric 10% și adus într-o eprubetă gradată cu dop rodat. Din această soluție se iau 2,5 ml și se tratează cu 2 ml acid fosfomolibdenic 1% în alcool și 1 ml amoniac concentrat.

Se măsoară extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 570$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 50 și 500 micrograme morfină, prin puncte din 50 în 50, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 4 (pentru că s-a lucrat cu 1/4 din probă), obținîndu-se concentrația C a morfinei, în μg, în probă.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg morfină/litru mediu biologic (de exemplu, urină).

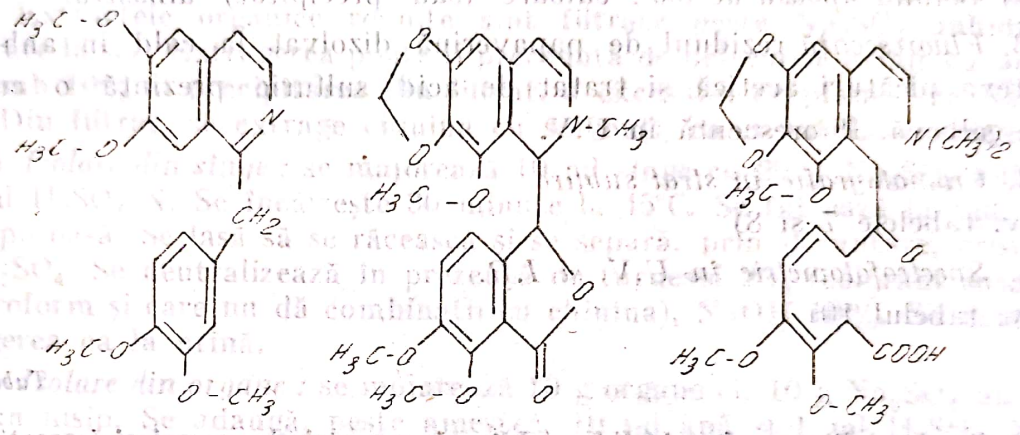
$$\text{mg morfină/litru urină} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația morfinei, în μg ;

A = volumul de produs biologic (de exemplu, urină), luat în lucru, în ml.

II.5.3. PAPAVERINA, NOSCAPINA (NARCOTINA) ȘI NARCEINA



Papaverina Noscapina (Narcotina) Narceina

Izolare

Papaverina se izolează din soluții apoase alcaline, iar noscapina (narcotina) și narceina din soluții apoase alcaline sau acide, cu solvenți organici.

Identificare

1. *Reacții de precipitare*

Papaverina, noscapina (narcotina) și narceina dau precipitate cu *reactivii generali de precipitare al alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

— *Papaverina*

a) Reziduul tratat cu un cristal de fericianură de potasiu și cîteva picături de *reactiv Marquis* dezvoltă o culoare albastră-verde care virează, succesiv, la violet, verde, galben.

b) Reziduul tratat cu *reactiv Wasicki* dă o culoare roșie-portocalie.

c) Reziduul tratat cu *acid sulfuric concentrat* prezintă, la încălzire, o culoare violetă (spre deosebire de morfină).

— *Noscapina (narcotina)*

a) Noscapina dă colorații cu unii dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor ca : *acidul sulfuric concentrat* (galben-verde, trece succesiv în por-

tocaliu și roșu-vișiniu); *reactivul Fröhde* (verde-albastru, trece în vișiniu cu exces de reactiv și la ușoară încălzire).

b) *Reacția Labat*: reziduul tratat cu 2—3 picături de acid galic 5% și 2 ml acid sulfuric concentrat, apoi încălzit pe baia de apă, dezvoltă o culoare verde. Reacția este caracteristică grupării metilenice și este dată și de apiol și chiar de urmele de eter etilic rămase de la extragere.

— *Narceina*

a) Narceina dă celorlalți cu unui dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor, ca: *reactivi Fröhde* (verde), *reactivul Marquis* (brun, trece în verde), *reactivul Mandelin* (verde-brun).

b) *Reacția Labat*: culoare verde.

c) *Soluția apoasă de iod*: culoare (sau precipitat) albastră.

3. *Fluorescență* reziduul de papaverină dizolvat la cald în anhidridă cu cîteva picături acetică și tratat de acid sulfuric prezintă o culoare verde-galbenă, fluorescentă în U.V.

4. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

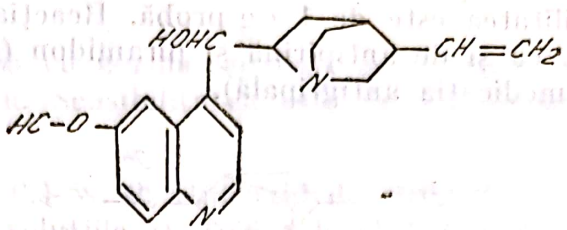
5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(v. tabelul 10)

Tabelul 10

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R., ale papaverinei, noscapinei (narcotinei) și narceinei (după Clarke, 1971)

Alcaloidul	*U.V. (maxime)*				*I.R. (în KBr)*		
	Apă	*Etanol*	*HCl 1 N*	*HCl 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Papaverina bază			254 284 310		1 507	1 068	1 273
Papaverina sulfat			250 254 310				
Noscapina bază		201 310			1 745	1 276	1 038
Noscapina clorhidrat	313						
Narceina bază				277			

II.5.4. CHININA ȘI CHINIDINA



Chinina
Chinidina (izomerul dextrogir cis)

A. **Izolare**

a) *Izolare din urină:* se alcalinizează 25 ml urină cu NaOH 10% la pH 9—10 și se extrag de 2—3 ori cu cîte 25 ml eter, cloroform sau dicloretan. Extractele organice reunite sînt filtrate peste Na_2SO_4 anhidru și evaporate la sec. Extragerea poate fi precedată de defecarea urinii cu acetat de plumb 10% și precipitarea din filtrat, a excesului de plumb, cu Na_2SO_4 20%. Din filtrat, se extrage chinina cu solvenți, ca în varianta precedentă.

b) *Izolare din sînge:* se majorează 10 ml sînge cu 20 g Na_2SO_4 anhidru și 7 ml H_2SO_4 N. Se încălzește 30 minute la 45°C. Se filtrează la vid, prin sticlă poroasă. Se lasă să se răcească și se separă, prin decantare, cristalele de Na_2SO_4. Se neutralizează în prezență de turnesol 2% (colorant insolubil în cloroform și care nu dă combinații cu chinina), NaOH 10%. Se continuă extragerea ca la urină.

c) *Izolare din organe:* se mojarează 10 g organe cu 10 g Na_2SO_4 anhidru și puțin nisip. Se adaugă, peste amestec, 10 ml apă și 1 ml H_2SO_4 N. Se continuă extragerea ca la urină.

B. **Identificare**

1. *Identificare rapidă din urină*

a) La 10 ml urină se adaugă 1 ml reactiv iodomercuriat de potasiu (3 g iodură mercurică, 2 g iodură de potasiu, 20 ml acid acetic glacial, apă distilată la 60 ml), cînd apare un precipitat alb, solubil la cald și care reprecipită la rece.

b) Se neutralizează 10 ml urină cu amoniac 10% și se adaugă 0,25 ml soluție de clorură de var (proaspăt preparată). Se agită și se adaugă, cu picătura, amoniac concentrat pînă la alcalinizare cînd apare un precipitat verde.

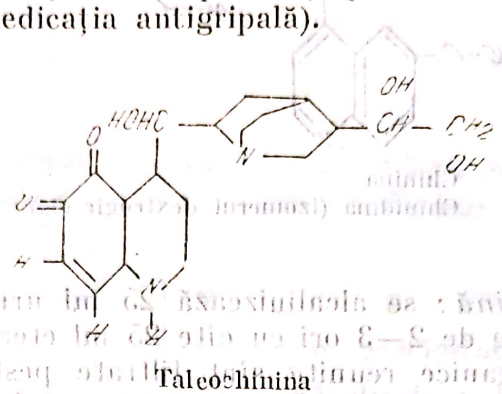
2. *Reacții de precipitare*

Chinina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5). Este caracteristică reacția cu *reactivul Dragendorff*, cînd se obține iodobismutat de chinină, precipitat roșu, solubil în ciclohexanonă, acetonă și eter acetic.

3. *Reacții de culoare*

a) *Reacția eritrochininei:* reziduul se tratează cu 2 ml cloroform, apoi cu 4 ml acid acetic 1% și apă de brom (soluția saturată se diluează 1:10 cu apă) cu picătura, numărînd picăturile, pînă la apariția culorii galbene persistente. Se adaugă soluție de ferocianură de potasiu 10% în proporție

de o picătură pentru 5 picături de brom, apoi amoniac 10% pînă la slabă alcalinizare, se agită. După separarea straturilor, cloroformul se colorează în roz-roșu. Sensibilitatea este de 1 μg/probă. Reacția este interferată de brucină și narceină, ca și de antipirină și piramidon (cu care chinina este adesea asociată în medicația antigripală).



Taleochinina

b) *Reacția taleochininei (tehnica Monnet)* : reziduul se tratează cu 2 ml cloroform. Se adaugă 3 ml acid acetic 1% și se agită, cînd apare fluorescența stratului apos. Se adaugă cu picătura, agitînd după fiecare adăugare, următorii reactivi; apă de brom (diluată 1%) pînă la obținerea culorii galbene persistente; a picătură NaOH 10%; amoniac 10% pînă la alcalinizare ușoară. Dacă nu se agită, stratul superior apos rămîne colorat în verde. Dacă se agită energic, stratul cloroformic este colorat în verde sau culoarea verde apare ca un inel între cele două straturi. Prin neutralizare cu HCl, culoarea virează în albastru, iar prin acidulare, trece în violet, apoi în roșu-brun. O nouă alcalinizare face să reapară culoarea verde. Reacția este mai puțin sensibilă decît reacția eritrochininei.

c) *Reacția Prudhomme :* reziduul se dizolvă în cîțiva mililitri apă și se tratează cu cîteva picături de eozină soluție 4%, cînd apare un precipitat roșu, solubil în cloroform. Reacția este sensibilă, dar nu specifică, fiind dată și de atropină, cinconină, efedrină, pilocarpină, ezerină.

3. *Fluorescență*

Reziduul solubilizat în H_2SO_4 5% prezintă fluorescență albăstruie în U.V. Reacția este împiedicată de ionii de clor. Reacția nu este specifică, dacă este pozitivă, se verifică natura alcaloidului prin cromatografie în strat subțire.

4. *Cromatografie în strat subțire* (v. tabelele 7 și 8).

Întrucît în sistemul de developare amoniac : metanol (1,5:100), Rf-urile foarte apropiate nu permit diferențierea chininei de chinidină, se folosește sistemul cloroform oficinal : dietilamină (9:1) (v/v), cînd se identifică chinina prin fluorescență sau prin pulverizare cu iodoplatinat. Rf sînt : chinină, 0,16, chinidină, 0,36.

5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— chinina bază în : etanol (236, 278, 332), H_2SO_4 0,1 N (250, 316, 346) ;
— chinidina bază în : etanol (236, 278, 332).

b) *I.R. (în KBr)*

— chinina bază : A(1235), B(1510), C(1030, 1619) ;
— chinidina bază : A(1258), B(1514), C(1040, 1619).

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Chinina formează cu eozina, eozinat de chinină, de culoare roșie, extractibil în cloroform. Sensibilitatea este de 0,1 μg/ml.

Reactivi

1. Acid sulfuric 0,1 N. 2. Hidroxid de sodiu 0,1 N. 3. Soluție tampon fosfați. Se amestecă soluțiile a) 1,36 g KH_2PO_4 în 30 ml apă și b) 4,15 g Na_2HPO_4 în 70 ml apă. 4. Soluție eozinat de sodiu sau potasiu 2%. 5. Cloroform. 6. Soluție standard stoc: se dizolvă 121 mg sulfat bazic de chinină în 1 000 ml acid sulfuric 0,1 N (1 ml = 0,1 mg chinină). 7. Soluție standard de lucru: se diluează soluția standard stoc cu apă distilată, în proporție de 1:20 (1 ml = 5 μg chinină).

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea urinii cu solvenți organici este dizolvat în cîteva picături acid sulfuric 0,1 N și adus cantitativ cu apă într-un balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluție, se neutralizează cu NaOH 0,1 N și se adaugă: 2 ml soluție tampon fosfat, 0,2 ml soluție eozinat și 4 ml cloroform. Se agită și se separă stratul cloroformic (eventual se filtrează).

Se măsoară extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 470$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor de cloroform.

Curba de etalonare se întocmerte între 1 și 15 μg chinină/5 ml, prin puncte din 3 în 3, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 5 (pentru că s-a lucrat cu 1/5 din probă), obținîndu-se concentrația C a chininei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg chinină/litru urină:

$$\text{mg chinină/litru urină} = \frac{C}{A}$$

în care:

C = concentrația chininei, în μg;

A = volumul de urină luat în lucru, în ml.

2. *Metoda fluorimetrică*

Principiu

Chinina în mediu de acid sulfuric prezintă fluorescență albastră în U.V. la 353 nm.

Reactivi

1. Acid sulfuric N; 2. Soluție standard stoc: se dizolvă 121 mg sulfat bazic de chinină în 1 000 ml acid sulfuric N (1 ml = 0,1 mg chinină); 3. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu H_2SO_4 N în proporție de 1 : 10 (1 ml = 10 μg chinină).

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea urinii cu solvenți organici este dizolvat în cîteva picături acid sulfuric N și adus cantitativ, cu acid sulfuric N, în balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluție, și se măsoară fluorescența la 353 nm, la o lampă U.V. prevăzută cu filtru Wood, față de o scară de etaloane cu concentrații cuprinse între 5 și 50 μg chinină/5 ml H_2SO_4 N (0,5—5 ml soluție standard de lucru completați la 5 ml cu H_2SO_4 N).

Calcul

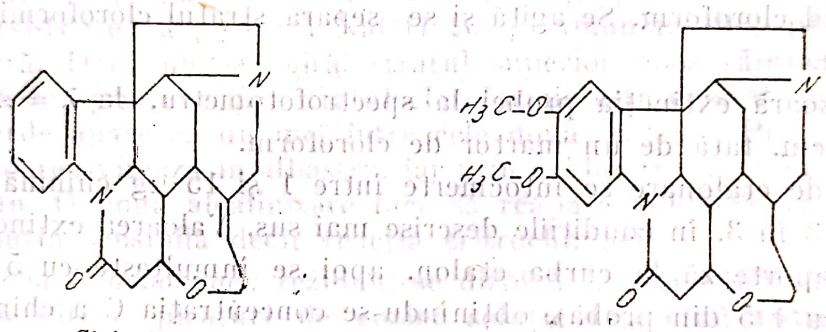
Rezultatele se exprimă în mg chinină/litru urină.

$$\text{mg chinină/litru urină} = \frac{C}{A} \cdot 5$$

în care:

C = concentrația chininei în 5 ml soluție, în μg;
A = volumul de urină luat în lucru, în ml.

II.5.5. STRICNINA ȘI BRUCINA



Stricnina Brucina

— *Stricnina*

A. Izolare

a) *Izolare din organe:* în metoda Stas-Otto-Ogier, se extrage stricnina din faza apoasă alcalină cu cloroform sau eter. Se adaugă întîi solventul și apoi se alcalinizează sub agitare continuă, deoarece stricnina eliberată prin alcalinizare trece în formă cristalină greu extractibilă de către solvent ori, alcalinizarea concomitent cu agitarea cu solvent, împiedică cristalizarea. Extragerea se poate face și cu cloroform : izopropanol (7 : 3). În cazul cercetării numai a stricninei, aceasta poate fi extrasă cu cloroform chiar din lichidul apos acid, după alcalinizare.

b) *Izolare din lichide biologice:* se alcalinizează 20 ml produs de analizat cu NaOH 10% și se extrage într-o pîlnie de separare cu un volum egal de cloroform. Se repetă operația de trei ori. Extractele cloroformice reunite sînt filtrate și evaporate la sec pe baia de apă.

c) *Izolare prin metoda Graham-Hoffman:* se adaugă la produsul biologic acid oxalic și se macerează la cald. Se filtrează. Se agită filtratul cu cărbune activat, care adsoarbe oxalatul de stricnină și stricnina rămasă liberă. Se

filtrează, se spală cu apă și se fierbe cărbunele cu alcool de 90° la reflux, cînd se separă, prin desorbție, oxalatul de stricnină. Se filtrează și se evaporă solventul. Reziduul este reluat cu apă alcalinizată. Se extrage stricnina bază cu cloroform.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Stricnina dă precipitate cu *reactivii de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5). Cu acidul picric *(reactivul Hager)* se obțin cristale caracteristice, în formă de „dinți de ferăstrău".

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția Bauer :* peste reziduu se adaugă o picătură de dicromat de potasiu 10% și se evaporă la sec pe baia de apă. După răcire, reziduul se reia cu acid sulfuric (90 g acid sulfuric concentrat și 36 g apă). În aceste condiții, reacția decurge mai lent decît cu acid sulfuric concentrat, însă culoarea violetă dată de stricnină nu este interferată de culorile rezultate prin carbonizarea substanței organice sub acțiunea acidului sulfuric concentrat. Culoarea violetă este fugace, trecînd prin roșu deschis la incolor. Sensibilitatea reacției este de un microgram. În loc de dicromat de potasiu, poate fi folosit alt oxidant (oxid de ceriu, dioxid de mangan, dioxid de plumb). Reacția este dată și de yohimbină, însă culoarea nu virează la roșu deschis. Reacția este împiedicată de prezența ptomainelor, neajuns care se remediază prin înlocuirea dicromatului cu fericianură de potasiu.

O variantă a reacției Bauer este următoarea : peste reziduul de pe o sticlă de ceas, se adaugă cîteva cristale de dicromat și cîteva picături de acid sulfuric concentrat. Dacă pe suprafața sticlei de ceas se trasează linii cu o baghetă, în urma baghetei apar striuri violete care virează la roșu și apoi dispar. Dacă purificarea reziduului nu a fost suficientă, culoarea violetă este mascată de o culoare brună, datorată carbonizării substanței organice de către acidul sulfuric concentrat.

b) *Reacția Malaquin (reacția tetrahidrostricninei) :* reziduul se reia cu 3—4 ml acid clorhidric concentrat și 1—2 granule de amalgam de zinc. Se fierbe cîteva minute. După răcire se decantează și se tratează cu o picătură de soluție de azotit de sodiu 0,1%, cînd apare o culoare roz-roșie stabilă, colorimetrabilă. Nu se folosește acid clorhidric diluat și nici azotit de sodiu mai concentrat (în acest caz, s-ar degaja vapori nitroși, care împiedică reacția). Lichidul colorat prezintă, la spectroscop, două benzi de absorbție în regiunea verde-albastră a spectrului. Fenotiazinele interferă reacția, însă colorația roz, dată de acestea, apare imediat după adăugarea acidului clorhidric și dispare prin reducerea cu amalgam de zinc, reapărînd, fugace, la tratarea cu nitrit de sodiu.

c) *Reacția cu reactivul Mandelin :* se obține o culoare albastră-violetă, care virează la roșu prin adăugare de apă sau prin alcalinizare. Sensibilitatea reacției este de 1 microgram.

d) *Reacția Prudhomme :* cu roșu de bromcrezol sau metilorange, stricnina formează un complex colorat, extractibil cu cloroform.

3. *Cromatografie în strat subțire*

(v. tabelele 7 și 8).

Scanned with OKEN Scanner

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— stricnina bază în: etanol (255), acid sulfuric 0,1 N (255)

b) *I.R. (în KBr)*

— stricnina bază: A (1 644), B (764, 1 392), C (1 480)

5. *Test fiziologic*

Stricnina bază se tratează cu acid clorhidric 1%, se evaporă la sec pe baia de apă, se reia reziduul cu 1 ml apă și se injectează în sacul limfatic sau se picură pe pielea unei broaște. În cazul injectării apar, la cîteva minute, convulsii tonicoclonice, iar animalul se așează în poziție opistotonos (în arc) (opiston = pe spate, tonos = tensiune, în l. greacă) (fig. 27). În cazul picurării, efectele apar la 30 minute—3 ore. Prin acest test, se poate identifica 1 microgram de stricnină.

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Stricnina se reduce la tetrahidrostricnină cu hidrogen în stare născîndă, apoi se oxidează cu nitrit de sodiu, cînd se obține o coloratie roz-roșie, colorimetrabilă. Sensibilitatea reacției este de 1 microgram/ml soluție.

Reactivi

1. Acid clorhidric 20% și acid clorhidric concentrat. 2. Amalgam de zinc. Se încălzesc părți egale de zinc și mercur într-o capsulă de porțelan sau de nichel, pînă la obținerea unei mase fluide omogene. După răcire, se sparge masa în granule. În lipsa amalgamului de zinc, se poate folosi zincul

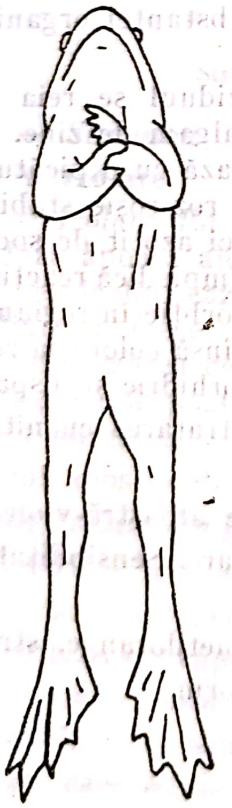


Fig. 27 — Poziția în opistotonus („stricninică") la broască.

Scanned with OKEN Scanner

granule, decapate și introduse într-o soluție de clorură mercurică, cînd mercurul se depune pe zinc. 3. Nitrit de sodiu 0,1%. 4. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,2567 g sulfat de stricnină (masa moleculară = 856,93) și se aduc cu apă la 100 ml (1 ml = 1 mg stricnină bază). 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 micrograme stricnină bază).

Modul de lucru

Reziduul de la evaporarea cloroformului alcalin este reluat cu acid clorhidric 20%, aducîndu-se la 25 ml într-un balon cotat. Se iau 2,5 ml, se completează la 5 ml cu apă, se tratează cu 3 ml acid clorhidric concentrat și se fierb 10 minute, după adăugare de 2 granule de amalgam de zinc. Se transvazează cantitativ, evitînd resturile de amalgam. Se tratează cu 0,1 ml nitrit de sodiu 0,1% și se aduce la 10 ml cu apă distilată.

Se măsoară extincția probei la spectrofotometru, la λ = 525 nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 2 și 20 μg prin puncte din 4 în 4, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 10 — pentru că s-a lucrat cu 1/10 din probă — obținîndu-se concentrația C a stricninei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatul se exprimă în mg stricnină/1 000 ml urină sau mg stricnină/100 ml sînge :

$$\text{mg stricnină/1 000 ml urină} = \frac{C}{A}; \quad \text{mg stricnină/100 ml sînge} = \frac{C}{A \cdot 10}$$

în care :

C = concentrația stricninei, în μg ;

A = volumul de urină (sînge) luat în lucru, în ml.

— *Brucina*

A. **Izolare**

Brucina se izolează din soluții apoase alcaline cu solvenți organici.

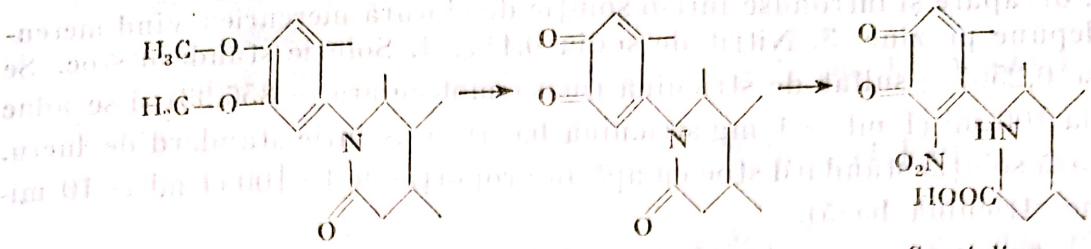
B. **Identificare**

1. *Reacția de precipitare*

Brucina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor.*

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția Noll (formarea cacotelinei)* : reziduul este tratat cu 1—2 picături de acid azotic concentrat și cîteva picături de acid sulfuric concentrat, cînd se obține o colorație roșie, care virează în portocaliu, apoi în galben, prin formarea cacotelinei. Dacă se tratează soluția galbenă de cacotelină cu clorură stanoasă sau sulfură de amoiu (ca reducători) apare culoarea violetă, datorată unui produs format prin reducere. Reacția servește la dozarea staniului ;



Brucina — Derivat ortochinonic al brucinei — Cacotelina

b) *Reacția cu clorat :* reziduul este tratat cu cîteva picături de acid sulfuric diluat și 2—3 cristale de clorat de potasiu, cînd se formează, la încălzire, o colorație roșie.

c) *Reacția cu apă de brom :* reziduul tratat cu cîteva picături de apă de brom și evaporat pe baia de apă, lasă un depozit roșu amorf de dibrombrucină.

3. *Cromatografie în strat subțire* (v. tabelele 7 și 8)

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— brucina bază în : etanol (267, 301), H_2SO_4 0,1 N (265, 300).

b) *I.R. (în KBr)*

— brucina bază : A (1 500, 1 649), B (1 190, 1 285, 1 400, 1 450).

— *Stricnina și brucina*

1. *Izolarea stricninei în prezența brucinei (metoda Lachain)*

Proba de analizat se tratează cu 3—5 ml acid sulfuric 5%, și se încălzește pe baia de apă la 50°C timp de 20 minute. În soluția caldă se adaugă 1—2 ml acid azotic fumans și se continuă încălzirea încă 10 minute. În aceste condiții, brucina trece în cacotelină, iar stricnina rămîne ca atare. Se alcalinizează cu amoniac concentrat și se extrage cu cloroform. Se repetă extragerea de 2—3 ori. Cacotelina rămîne în soluția apoasă, iar stricnina trece în cloroform. Extractele cloroformice reunite sînt filtrate și evaporate la sec.

2. *Identificarea stricninei în prezența brucinei (în cazul preparatelor galenice de Nux vomica)*

Reziduul este tratat cu acid azotic și acid sulfuric, cînd apare o culoare roșie care virează în galben (reacția Noll pentru brucină). În soluția galbenă, se adaugă cîteva cristale de bicromat, cînd se dezvoltă culoarea violetă (reacția Bauer pentru stricnină).

3. *Separarea electroforetică a stricninei de brucină*

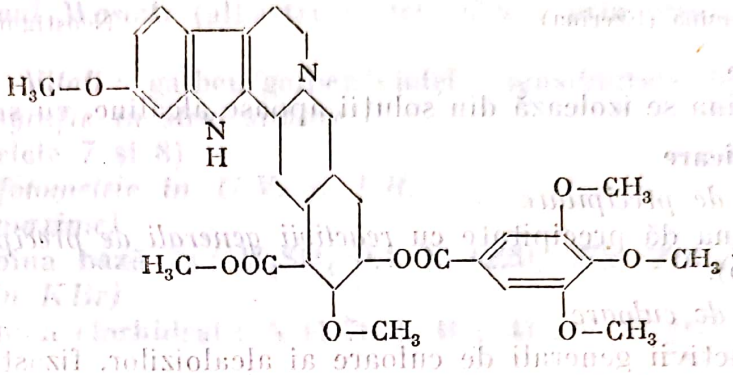
Se utilizează ca electrolit, în electroforeză pe hîrtie, acid formic 2 N. Relevarea se efectuează cu reactivul Munier-Macheboeuf *(Dragendorff modificat)*. Se disting două zone electroforetice, cea mai apropiată de start fiind brucina. Metoda este indicată pentru cantități mici din cei doi alcaloizi.

Dragendorff modificat

Reactivul (Munier-Macheboeuf) : Soluția A : se dizolvă 0,85 g subnitrat de bismut într-un amestec de 10 ml acid acetic glacial și 40 ml apă. Soluția B :

se dizolvă 8 g iodură de potasiu în 20 ml apă. În momentul întrebuințării, se amestecă 10 ml soluție A și 10 ml soluție B, apoi se adaugă 20 ml acid acetic glacial și 100 ml apă.

II.5.6. REZERPINA



A. Izolare

Rezerpina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici (preferabil cloroform).

B. Identificare

1. *Reacții de precipitare*

Cu tiocianatul de amoniu, se obțin cristale în formă de plăcuțe.

2. *Reacții de culoare*

a) Dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor, rezerpina dă colorații cu *reactivul Marquis* (verde-cenușiu trece în brun, sensibilitate 0,1 micrograme), *reactivul Fröhde* (albastru, sensibilitate 0,1 micrograme), *reactivul Mandelin* (verde, sensibilitate 0,1 micrograme), *reactivul Lafon* (verde-oliv, sensibilitate un microgram).

b) *Reacția Vitali :* purpuriu/portocaliu/brun deschis/. Sensibilitate 1,0 micrograme.

c) *Reacția cu vanilină :* se tratează reziduul cu 4 ml acid citric 2% și se agită pînă la dizolvare. Se adaugă 6 ml acid sulfuric (5 ml acid sulfuric concentrat și 2,5 ml apă) și 2 ml reactiv vanilic (0,2 g vanilină în 10 ml acid clorhidric concentrat). Se agită și la 15 minute apare o colorație roz.

3. *Fluorescență*

Rezerpina solubilizată în acid sulfuric, prezintă fluorescență verde în U.V.

4. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

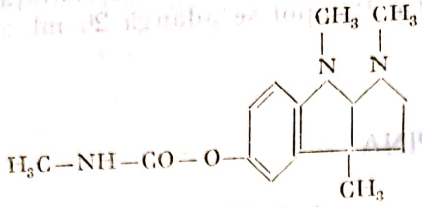
a) *U.V. (maxime)*

— rezerpina bază în etanol (267, 294)

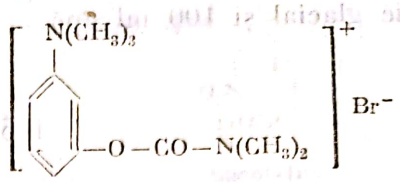
b) *I.R. (în KBr)*

— rezerpina bază : A (1 120, 1 220), B (1 330).

II.5.7. FIZOSTIGMINA (EZERINA) ȘI NEOSTIGMINA



Fizostigmina (Ezerina)



Neostigmina

A. **Izolare**

Fizostigmina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Fizostigmina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

Dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor, fizostigmina dă colorații mai nete de *acidul azotic* (galben, trece în verde-oliv, apoi în roșu), *reactivul Erdman* (galben, trece în roșu), *reactivul Mandelin* și *reactivul Lafon* (galben, trece în brun la încălzire), *reactivul Wasicki* (verde intens).

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

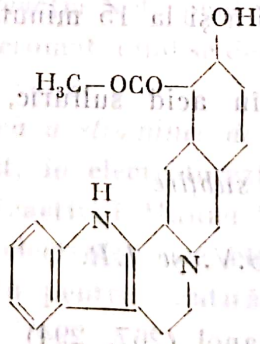
a) *U.V. (maxime)*
— fizostigmina bază : în H_2SO_4 0,2 N (246, 302)
— neostigmina metilsulfat : în H_2SO_4 1 N (260, 266)

b) *I.R. (în KBr)*
— fizostigmina bază : A (1 200, 1 243, 1 495, 1 724)
— neostigmina bromură : A (1 722,) B (1 215), C (1 154)

5. *Test fiziologic*

Fizostigmina instilată în ochiul de iepure determină mioză.

II.5.8. YOHIMBINA



A. **Izolare**

Yohimbina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Yohimbina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 1).

2. *Reacții de culoare*

a) Dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor, yohimbina dă colorații cu *reactivul Mandelin* (albastru), *reactivul Erdman* (albastru închis, trece în verde, apoi în brun), *reactivul Marquis* (verde, trece în brun-violaceu la cald), *reactivul Wasicki* (albastru-violet închis, prin alcalinizare trece în brun).

b) *Reacția Vitali :* galben/galben/violet ; sensibilitate 0,1 micrograme.

3. *Cromatografie în strat subțire*

(v. tabelele 7 și 8)

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

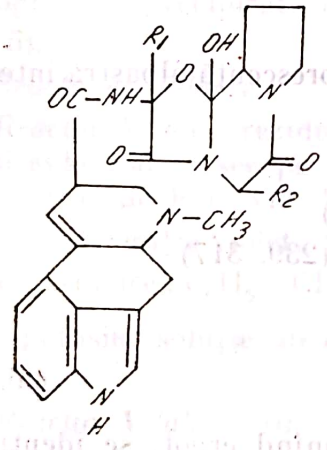
a) *U.V. (maxime)*

— yohimbina bază în : H_2SO_4 0,1 N (220, 272, 278, 287)

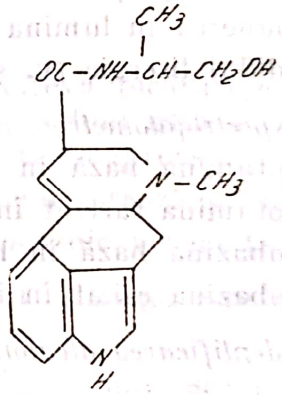
b) *I.R. (în KBr)*

— yohimbina clorhidrat : A (1 705), B (741), C (1 160, 1 197, 1 436).

II.5.9. ALCOLOIZII DIN ERGOTUL DE SECARĂ



Alcaloizii din ergot



Ergometrina (Ergobazina)

		R_1 :	R_2
Ergotoxina	Ergotamina	$-CH_3R_2$:	$-CH_2-C_6H_5$
	Ergozina	$-CH_3$	$-CH_2-CH(CH_3)_2$
	Ergocristina	$-CH(CH_3)_2$	$-CH_2-C_6H_5$
	Ergocriptina	$-CH(CH_3)_2$	$-CH_2CH(CH_3)_2$
	Ergocornina	$-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$

A. **Izolare**

Alcaloizii din ergot se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

a) *Reactiv Hager :* aglomerări de cristale în formă de bastonașe

b) *Acid trinitrobenzoic :* cristale în formă de dendrite.

2. *Reacții de culoare*

— Ergotamina :	*Reactiv Marquis :* brun *Molibdat de amoniu :* cenușiu-albăstrui *Vanadat de amoniu :* brun *Reacția Vitali :* portocaliu/portocaliu/violet ; sensibilitatea 0,5 μg
— Ergobazina : (Ergometrina)	*Reactiv Marquis :* brun *Molibdat de amoniu :* verde, trece în roșu, apoi în albastru *Reacția Vitali :* portocaliu/galben/purpuriu ; sensibilitate 0,25 μg.
— Ergotoxina :	*Reactiv Fröhde :* violet-albastru, trece în verde *Reactiv Mandelin :* violet, trece în verde *Reactiv Marquis :* negru cu contur violet *Reactiv Lafon :* galben, trece în galben-verde, apoi în verde intens cu contur roșu *Reacția Wasicki :* violet deschis *Acid sulfuric :* galben, trece în verde-oliv, apoi în verde intens.

3. *Cromatografie în strat subțire*

Expunerea în lumina U.V. revelează fluorescență albastră intensă datorată acidului lisergic (v. și tabelele 7 și 8).

4. *Spectrofotometrie în U.V. (maxime)*

Ergotamina bază în H_2SO_4 0,1 N (315)
Ergotamina tartrat în acid tartric 10% (239, 317)
Ergobazina bază în H_2SO_4 0,1 N (312)
Ergobazina esilat în izopropanol (320).

5. *Identificarea alcaloizilor globali*

În intoxicația cu produse galenice conținînd ergot, se identifică alcaloizii globali, astfel : extractul eteric (din vomă, spălături stomacale, corp delict se împarte în patru porțiuni :

— la încălzire cu KOH 10%, se degajă un miros neplăcut de trimetilamină ;

— la tratare cu 5 ml soluție de oxalat de sodiu 5%, apare o colorație roșie ;

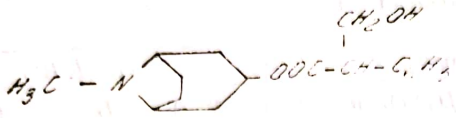
— la tratare cu 5 ml H_2SO_4, apare o colorație portocalie și un inel albastru la limita dintre cele două lichide ;

— la agitare cu bicarbonat de sodiu, apare o colorație roșie-violetă.

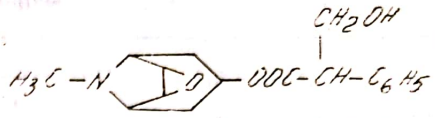
6. *Examen microscopic*

În conținutul stomacal sau în corpul delict (făină suspectă), se pun în evidență resturi formate din celule inegale, mici, rotunjite sau alungite, strîns unite între ele. Fragmentele stratului periferic sînt colorate în brun-violaceu.

II.5.10. ATROPINA, HIOSCIAMINA ȘI SCOPOLAMINA



Atropina
(amestec din părți egale de (l) și (d) hiosciamină)



Scopolamin

A. **Izolare**

a) *Izolare din urină, sînge, corp delict :* se extrage cu cloroform sau benzen după alcalinizare cu amoniac (nu cu hidroxid de sodiu sau potasiu). Se repetă extragerea de 2—3 ori. Extractele organice reunite sînt evaporate la sec la 50°C.

b) *Izolare din organe :* se folosește metoda Stas-Otto-Ogier, extrăgînd cu cloroform și respectînd măsurile de precauție de mai sus.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Atropina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția Vitali :* reziduul este tratat cu cîteva picături acid azotic funans și evaporat la sec pe baia de apă. Peste reziduul galben, se adaugă cîteva picături de hidroxid de potasiu 10% în etanol (proaspăt preparat), cînd apare o colorație violetă trecătoare. Reacția se datorează acidului tropic, care avînd gruparea $C_6H_5-\underset{|}{C}H$ trece în acid nitrobenzoic, iar acesta, cu hidroxidul de potasiu, soluție alcoolică, trece în violet. Reacția este dată și de hiosciamină.

b) *Reacția Vitali-Morin :* reziduul obținut la nitrare este dizolvat în 2—3 ml acetonă, iar soluția acetonică tratată cu KOH soluția 10% în metanol dă o colorație violetă.

c) *Reacția Rathenssinkam* (variantă a reacției Morin): reziduul este tratat cu cîteva picături acid azotic fumans și evaporat pe baia de apă. Reziduul nitrat este reluat cu 1—2 picături $SnCl_2$ 10% (soluție proaspăt preparată), încălzind 2—3 minute. După răcire, se tratează cu 2—3 picături nitrit de sodiu 1% și apoi cu 3—4 picături soluție de beta-naftol 1% în amoniac 10%, cînd se formează un precipitat (sau colorație) roșu-portocaliu.

e) *Reactiv Wasicki :* atropina, ca și hiosciamina și scopolamina, prezintă colorații violete.

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(v. tabelul 11)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale atropinei, hiosciaminei și scopolaminei (după Clarke, 1971)

Alcaloidul	*U.V. (maxime)*			*I.R. (în KBr)*		
	Apă	*Etanol*	*H_2SO_4 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Atropina			252, 258, 264	1 720	1 035	1 153
Scopolamina bază			251, 257, 263	1 725	1 041, 1 165	1 060
Scopolamina clorhidrat	247, 253, 265					
Hiosciamina		247, 255, 264				

5. *Test fiziologic*

Se dizolvă reziduul în acid clorhidric diluat și se evaporă la sec. Reziduul neutru se dizolvă în puțină apă și se instilează 2 picături într-un ochi de pisică. Se urmărește midriaza în raport cu celălalt ochi. Unele ptomaine au o slabă activitate midriatică.

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică Bratton-Marshal (tehnica Syostrőm)*

Principiu

Atropina este nitrată cu acid azotic. Nitroderivatul este redus la aminoderivat cu hidrogen în stare născîndă. Aminoderivatul este diazotat și apoi cuplat cu naftiletilendiamină (NED), cînd se obține o colorație violacee, colorimetrabilă. Reacția de diazotare este pozitivă pentru compușii care conțin un radical benzoil : atropina, cocaina, stovaina, precum și unele ptomaine.

Reactivi

1. Acid azotic concentrat ; 2. Acid clorhidric 5% ; 3. Zinc granule ; 4. Nitrit de sodiu 0,1% (proapăt preparat) ; 5. Sulfamat de amoniu 2,5% (soluția se poate conserva două săptămîni la frigider) ; 6. Naftiletilendiamină clorhidrică 1% (soluția se poate conserva o săptămînă la frigider, în sticle mici, brune) ; 7. Soluție standard stoc. Se cîntărește 0,1200 g atropină sulfurică monohidrat și se aduce cu apă la 100 ml (1 ml = 1 mg atropină) ; 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1 : 10 (1 ml = 100 μg atropină).

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea probei de analizat este reluat cu apă acidulată cu acid azotic concentrat și adus cu apă la 10 ml într-o eprubetă gradată cu dop. Într-un pahar Berzelius mic se ia 1 ml din acest lichid și se evaporă la sec pe baia de apă. Se repetă nitrarea de 2—3 ori. Reziduul obținut se dizolvă în 2 ml HCl 5%, se adaugă 0,2—0,3 g zinc, se acoperă și se încălzește 10 minute pe baia de apă. Se răcește și se filtrează cantitativ într-o eprubetă gradată. Se adaugă 0,2 ml nitrit de sodiu 0,1%, se agită și, după

Scanned with OKEN Scanner

10 minute, se distruge excesul de nitrit cu 1 ml sulfamat de amoniu 10%. După 10 minute se tratează cu 1 ml NED și se aduce la 5 ml cu apă.

Se măsoară extincția probei după 30—60 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 525$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 100 μg atropină, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 10 (deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă) obținîndu-se concentrația C a atropinei, în μg, în probă.

Calcul

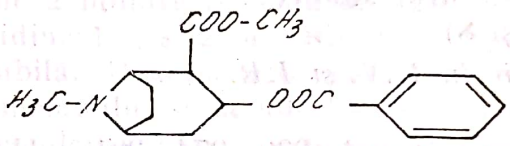
Rezultatele se exprimă în mg atropină/1 000 ml produs biologic :

$$\text{mg atropină/1 000 ml produs biologic} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația atropinei, în μg ;
A = volumul probei biologice luat în lucru, în ml.

II.5.11. COCAINA



A. Izolare

a) *Izolare din organe :* se extrage din soluțiile apoase alcaline, cu următoarele precauțiuni, spre a evita hidroliza : macerarea se execută la rece ; operația de extragere se conduce rapid ; se evită soluțiile prea acide sau prea alcaline ; evaporările se execută la temperatura laboratorului sau la un curent de aer ; din hidroliză rezultă metanol, care se poate identifica.

b) *Izolare din vomă, conținut stomacal, lichide biologice :* se extrage cu eter din produsul alcalinizat la pH 8 cu hidrogencarbonat de sodiu.

c) *Izolare de pe mucoasa nazală (la cocainomani) :* se prelevă mucozitățile cu ajutorul unui tampon de vată, care apoi este extras cu eter.

B. Identificare

1. *Reacții de precipitare*

a) Cocaina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

b) Reziduul dizolvat în 1—2 picături de acid sulfuric 10% se tratează cu 2 ml *soluție permanganat de potasiu 3,5%*, cînd apare un precipitat violet, care la microscop, se prezintă sub formă de cristale rectangulare, unele întrepătrunse.

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția Pesez (variantă a reacției Vitali) :* reziduul se tratează cu 2—3 picături de acid azotic concentrat și 10—15 picături acid sulfuric concentrat. Se solubilizează cu ajutorul unei baghete și se încălzește 5—10 minute pe

Scanned with OKEN Scanner

baia de apă. Se răcește și se adaugă 1 ml apă, cînd apare o culoare galbenă strălucitoare. Se transvazează într-o eprubetă și se adaugă 10 ml acetonă. Se răcește și se agită puternic cu 5 ml hidroxid de sodiu 50%. Faza apoasă rămîne galbenă, iar la zona de contact cu acetona apare un inel albastru-violaceu, care prin agitare difuzează în toată masa acetonică. Culoarea albastră trece în violet și, în final, în roșu-închis.

b) *Reacția Ferreira de Silva :* se nitrează reziduul cu cîteva picături de acid azotic concentrat și se evaporă la sec. Reziduul cald este tratat cu cîteva picături de hidroxid de potasiu 10% în alcool. Se dezvoltă un miros de benzoat de etil, sau, dacă alcaloidul este în cantitate mare, o colorație roșie-purpurie.

c) *Reacția* Guerbet : (v. Atropina).

3. *Diferențierea cocainei de atropină prin reacția Pesez*

Diferențierea se face pe baza colorației fazelor, astfel :

Alcaloidul	*Coloratia fazei*		
	acetonice	*după alcalinizare*	*apoase*
Atropina	galben	albastru	incolor
Cocaina	incolor	roșu închis	galben

4. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

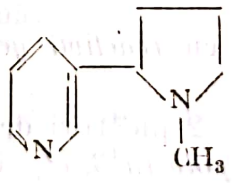
a) *U.V. (maxime)*
— cocaina bază în : etanol (230, 274, 281) ; H_2SO_4 0,1 N (233, 275)
— cocaina clorhidrat în : apă (233, 274).

b) *I.R. (în KBr)*
— cocaina bază : A (1 275), B (1 700), C (1106, 1 728).

6. *Test fiziologic*

Cocaina aplicată pe vîrful limbii determină anestezie. Instilată în ochiul de pisică sau iepure, provoacă midriază (celălalt ochi servește drept martor).

II.5.12. NICOTINA



A. **Izolare**

a) *Izolare din organe, lichide biologice, soluții insecticide.*

Se aplică metoda Stas-Otto-Ogier sau se antrenează cu vapori de apă.

b) *Izolare din urină :* 1. Se antrenează cu vapori de apă, după alcalinizarea urinii la pH 11—12 cu NaOH 10%. Se culege distilatul în acid clor-

hidric 0,1 N. În aceste condiții, nu sînt antrenați, alături de nicotină, și compuși cu structură similară, ca amida acidului nicotinic prezentă în mod normal în organism. 2. Se extrage cu cloroform urina alcalinizată la pH 11—12 cu NaOH 10% și se repetă extragerea de 2—3 ori. Peste extractele cloroformice reunite se adaugă 1—2 picături de acid clorhidric 0,1 N și se evaporă la 40—50°C, pe baia de apă sau la temperatura laboratorului.

c) *Izolare din aer :* se barbotează aerul prin acid sulfuric diluat.

d) *Izolare din tutun :* se macerează tutunul într-o soluție alcalină timp de 30 minute. Se filtrează și se extrage cu cloroform. Se repetă extragerea de 2—3 ori. Extractele cloroformice reunite sînt evaporate. Se reia reziduul cu acid acetic 1% sau cu o soluție foarte diluată de etanol.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Nicotina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor.* Sînt mai sensibili *reactivii Bouchardat, Dragendorff* (tabelul 5) și *reactivul Sonnenschein.* În soluții mai concentrate cu *reactivul Hager,* se obține picrat de nicotină, cristale cu p.t. 217°C.

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția König :* se neutralizează 5 ml soluție de analizat cu acid acetic 10% sau acid clorhidric 10%. Se adaugă 1 ml soluție bromcian, proaspăt preparată și se menține 2 minute pe baia de apă la 80°C. Se adaugă 3 ml soluție acetat de benzidină 1% și 2 ml HCl 20%. Apare o colorație galben-portocalie, colorimetrabilă. Reacția este caracteristică nucleului piridinic, care sub acțiunea bromcianului se scindează cu formare de aldehidă glutaconică. Aceasta, prin condensare cu o amină primară, formează o aldimină galben-portocalie. Sensibilitatea reacției este de cîteva micrograme. Bromcianul se prepară adăugînd o soluție de cianură de potasiu 10%, peste apă saturată cu brom pînă la decolorare. Pentru a elimina riscul legat de manipularea cianurii de potasiu, se poate utiliza în loc de bromcian, bromtiocian, preparat din tiocianat de potasiu, în loc de cianură de potasiu.

b) *Reacția cu p-dimetilaminobenzaldehidă :* se tratează soluția de nicotină cu 1—2 ml soluție de p-dimetilaminobenzaldehidă 10% în acid clorhidric concentrat, cînd apare o colorație violetă.

c) *Reacția cu epiclorhidrină :* se dizolvă reziduul în 2—3 ml epiclorhidrină, cînd, prin încălzire, se dezvoltă o colorație roșie.

3. *Reacții microcristalografice*

a) *Reacția Rőussin :* se tratează reziduul dizolvat în eter cu o soluție eterică de iod 2—3%. Se separă un lichid uleios roșu-brun, din care, după cîteva ore, apar cristale aciculare roșii-rubinii, transparente, de iod-nicotină. Hiosciamina dă, în aceleași condiții, cristale brun-închis.

b) *Reacția Dragendorff :* peste o picătură de alcaloid bază se adaugă o picătură de reactiv Dragendorff, cînd se formează cristale roșii-închis pînă la negru, cu aspect, la microscop, de „păsări în zbor". Sensibilitatea reacției este de 1 microgram.

4. *Cromatografie în strat subțire* (v. tabelele 7 și 8)

Pentru separarea nicotinei de alcaloizii secundari din tutun, se poate utiliza reacția König.

Scanned with OKEN Scanner

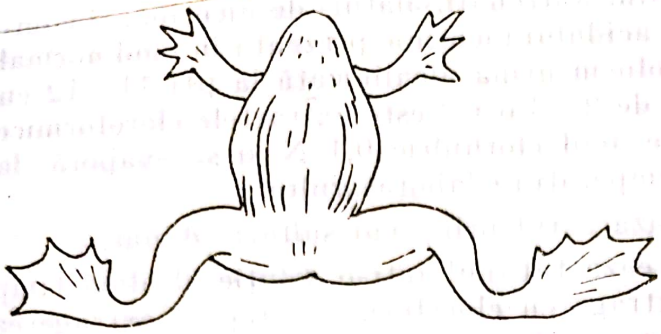


Fig. 28 — Poziția „nicotinică" la broască.

5. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

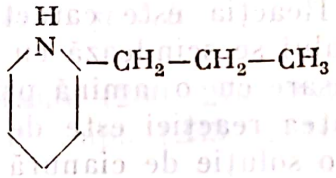
a) *U.V. (maxime)*
— nicotina bază în : H_2SO_4 0,1 N (260), NaOH 0,5 N (257, 262, 268).

b) *I.R. (în KBr)*
— nicotina bază : A (712), B (1 429), C (810, 1 022).

6. *Test fiziologic*

Prin injectarea clorhidratului de nicotină în sacul limfatic al broaștei, se obține „poziția nicotinică" (fig. 28).

II.5.13. CONIINA



A. **Izolare**

Coniina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici sau prin antrenare cu vapori de apă.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

a) Coniina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

b) *Reacția cu sulfură de carbon :* prin tratare cu CS_2 se obține sarea acidului coniincarbamic, $C_8H_{16}NCSSH \cdot NC_8H_{17}$, cristalizată în ace galbene, cu p.t. 71—72°C.

c) Clorhidratul coniinei, obținut prin evaporarea coniinei în soluție de acid clorhidric foarte diluat, cristalizează în ace sau prisme alungite, dispuse în stea sau dendrite, cu caracter birefringent.

2. *Reacții de culoare*

a) Coniina nu dezvoltă colorație cu majoritatea *reactivilor generali de culoare.*

b) *Reacția cu cloranil (tetraclorochinonă) :* în soluție benzenică, coniina dă o colorație verzuie.

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8).

Scanned with OKEN Scanner

4. *Spectrofotometrie în U.V.*

Coniina bază în H_2SO_4 0,2 N : maxime între 266 și 270 nm.

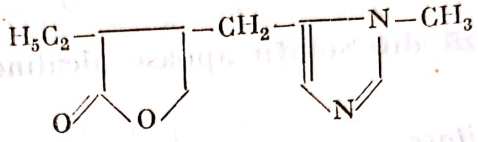
5. *Examen microscopic*

Se poate executa identificarea botanică a corpului delict sau a fragmentelor de vomă sau stomac.

6. *Test fiziologic*

Extractul eteric alcalin injectat la broască determină convulsii asemănătoare celor strichninice.

II.5.14. PILOCARPINA



A. **Izolare**

Pilocarpina se izolează din mediu alcalin (*p*H 8—9) cu cloroform sau eter. Alcalinizarea se face cu hidrogencarbonat de sodiu sau amoniac. Reziduul uleios rămas după evaporarea solventului este reluat cu apă acidulată.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Pilocarpina dă precipitate cu unii *reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția de dicromat de potasiu :* se agită 2 ml soluție de analizat cu un cristal de dicromat de potasiu, apoi cu 2 ml cloroform și 1 ml apă oxigenată. Stratul cloroformic apare colorat în albastru sau albastru-indigo, iar stratul apos, în galben.

b) *Reacția cu nitroprusiat de sodiu :* se tratează 2 ml soluție de analizat cu 1 ml nitroprusiat de Na 2% și 1 ml hidroxid de sodiu 4%. Apare o colorație galbenă, care prin acidulare cu acid clorhidric diluat trece în roșu-rubiniu. Se împarte lichidul în două porțiuni : în prima, se adaugă cîteva picături tiosulfat de sodiu 10%, cînd se dezvoltă o colorație verde ; în a doua, se adaugă o picătură de apă oxigenată, cînd apare o colorație roșu-carmin.

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8).

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— pilocarpina bază în H_2SO_4 0,2 N (215)

b) *I.R. (în KBr)*

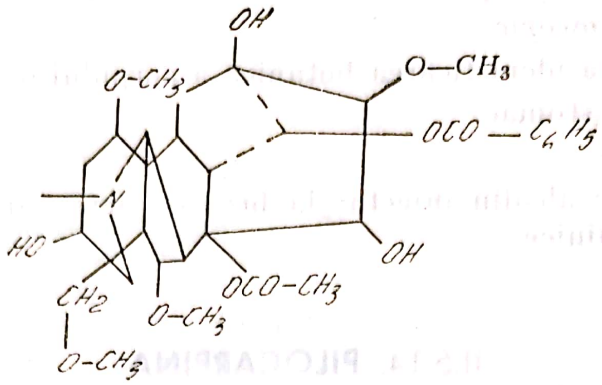
— pilocarpina bază : A (1 752), B (1 168), C (660, 1 104).

5. *Test fiziologic*

Pilocarpina instilată în ochiul de iepure determină mioză.

Scanned with OKEN Scanner

II.5.15. ACONITINA



A. **Izolare**

Aconitina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Aconitina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

Reacțiile de culoare sînt puțin caracteristice, astfel încît expertiza toxicologică este dificilă. În afară de unii reactivi generali de culoare ai alcaloizilor, se execută și următoarele reacții de culoare:

a) *Reacția Millaneh:* reziduul tratat cu un cristal de fericianură de potasiu și o picătură de acid formic dezvoltă o colorație verde. Reacția diferențiază aconitina de morfină, stricnină, hiosciamină.

b) *Reacția cu rezorcină:* reziduul tratat cu 1 ml acid sulfuric concentrat se încălzește 5 minute pe baia de apă, apoi se adaugă un cristal de rezorcină și se continuă încălzirea încă 20 minute, cînd apare o colorație roșie-violetă. Se răcește și se neutralizează cu soluție saturată de carbonat de amoniu. Dacă aconitina este pură, lichidul devine incolor cu fluorescență albastră. În prezența impurităților, lichidul este purpuriu cu fluorescență verde.

c) *Reacția cu reactivul fosfomolibdic:* reziduul tratat cu cîteva picături din acest reactiv și încălzit ușor pînă la emiterea de vapori, dezvoltă o colorație violetă. O colorație roșie-violetă este dată și de veratrină. Reactivul se prepară din 4 g molibdat de amoniu și 100 ml acid fosforic d = 1,70.

3. *Reacție cristalografică*

Se dizolvă pulberea de aconitină într-o picătură de acid sulfuric 1% și o picătură de permanganat de potasiu 1%. După 15 minute apare un precipitat cristalin format din prisme roșii-violete.

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— aconitina bază în: (228, 270), H_2SO_4 0,1 N (234, 275).

b) *I.R. (în KBr)*

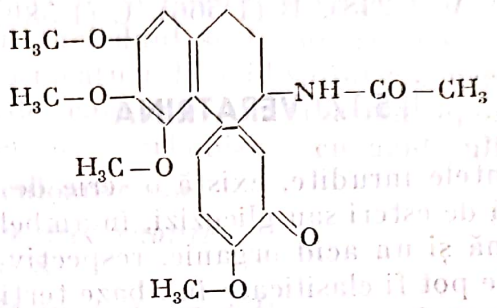
— aconitina bază: A (1 992, 1 273), B (1 713).

Scanned with OKEN Scanner

5. *Test fiziologic*

Dozele minime de toxic existente în organism (datorită marii toxicități a aconitinei) în cazul intoxicației acute, fac ca metodele chimice să fie, adesea, inoperante. Testul fiziologic poate fi util și se execută astfel : soluția de aconitină injectată la cobai determină convulsii violente și pareza membrelor posterioare, apoi anterioare, chiar la concentrații de 1/10 mg aconitină. Injectat la broască, se constată contracții anarhice ale cordului chiar la concentrații de 1/40 mg aconitină.

II.5.16. COLCHICINA



A. **Izolare**

Colchicina se izolează prin metoda Stas-Otto-Ogier, atît din mediul acid, cît și din mediul alcalin. Solventul preferat este cloroformul în mediu alcalin.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Dintre *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* sînt mai sensibili *reactivul Bouchardat* și *reactivul Dragendorff* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

a) Dintre *reactivii generali de culoare ai alcaloizilor*, colchicina dă colorații cu :

— *acid azotic concentrat :* coloratie violetă care trece în roșu-portocaliu prin alcalinizare *(reacția Geiger) ;*

— *acid sulfuric concentrat :* coloratie galbenă ; dacă se adaugă un cristal de azotat de potasiu se dezvoltă o coloratie albastră, apoi verde, violetă, roșie și galbenă. Uneori violetul apare concomitent cu verdele, încît aspectul este al unui centru verde înconjurat de un lizereu violet. Dacă se alcalinizează cu hidroxid de potasiu 10%, apare o coloratie roșie ;

— *reactivul Lafon :* albastru-verde, verde, apoi brun ;

— *reactivul Fröhde :* galben ;

— *reactivul Mandelin :* galben deschis.

b) *Reacția Pesez :* se tratează soluția apoasă cu izoniazidă 10% și carbonat de sodiu 10%, apoi se încălzește pe baia de apă 10 minute, cînd se observă o coloratie galbenă-portocalie, fotometrabilă la 460 nm.

c) *Reacția Vitali* : purpuriu/brun/roșu-brun. Sensibilitate 0,25 μg.

Scanned with OKEN Scanner

d) *Reacția cu apă de clor :* precipitat solubil în amoniac cu apariția culorii roșii.

e) *Reacția Zeisel* (diferențierea colchicinei de ptomaine) : prin încălzire cu acid clorhidric concentrat colchicina este demetilată, iar gruparea hidroxil liberă dă culoare verde, fotometrabilă, cu clorura ferică 1%. Ptomainele nu dau, în aceste condiții, colorație.

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8).

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

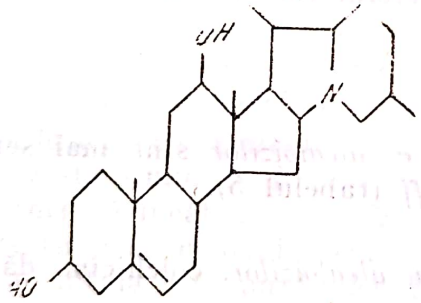
— colchicina bază : în etanol 1% (243, 350).

b) *I.R. (în KBr)*

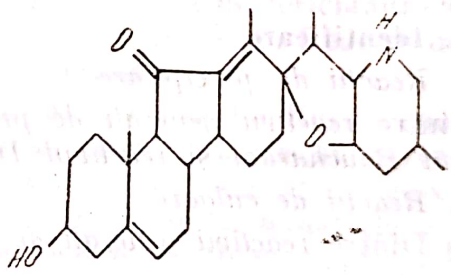
— colchicina bază : A (1 248), B (1 566), C (1 589).

II.5.17. VERATRINA

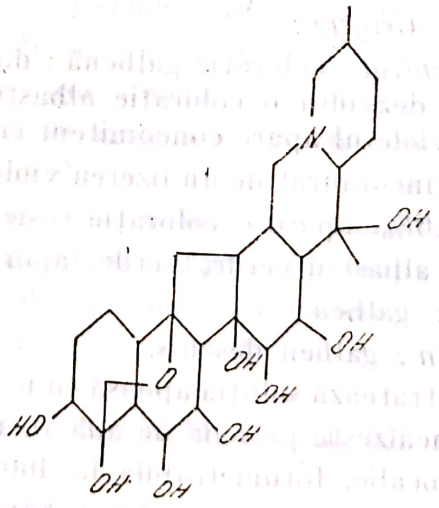
În Veratrum și plantele înrudite, există o serie de alcaloizi cu structură asemănătoare, sub formă de esteri sau glicozizi, în ambele cazuri eliberîndu-se prin hidroliză, o alcamină și un acid organic, respectiv o oză. Din punct de vedere chimic, alcaminele pot fi clasificate în : baze terțiare cu nucleu sterolic (de exemplu, rubijervina) ; baze secundare cu nucleu sterolic inversat (de exemplu, jervina) ; baze terțiare cu nucleu sterolic inversat, polihidroxilate (de exemplu, protoverina) :



Rubijervina



Jervina



Protoverina

A. **Izolare**

Veratrina se izolează din mediu acid sau alcalin cu solvenți organici, preferabil cloroform. Reziduul obținut este slab colorat.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Veratrina dă precipitate cu *reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor* (tabelul 5).

2. *Reacții de culoare*

a) Dintre *reactivii generali de culoare ai alcaloizilor* veratrina dă colorații cu *reactivul Erdman* (galben, trece în roșu-portocaliu), *reactivul Fröhde* (galben, trece lent în roșu), *acid sulfuric concentrat* (galben cu fluorescență verde; lichidul trece în roșu-carmin și coloratia dispare prin încălzire).

b) *Reacția Weppen :* reziduul se triturează cu cîteva cristale de zahăr pulverizat, apoi cu 2—3 picături de acid sulfuric concentrat, cînd se dezvoltă o colorație galbenă-verde, care trece în albastru, apoi în violet. Excesul de zahăr dă culori interferente (carbonizare cu acid sulfuric).

c) *Apă de brom :* culoare roșie.

3. *Cromatografie în strat subțire*
(v. tabelele 7 și 8)

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

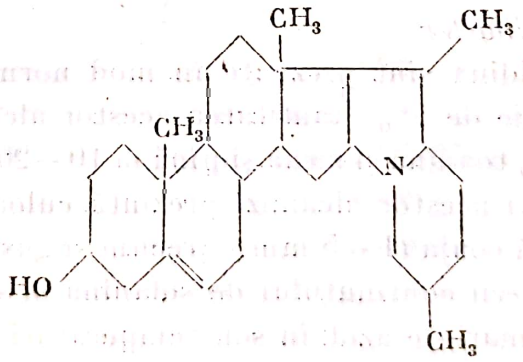
— veratrina bază în H_2SO_4 0, N (263, 293).

b) *I.R. (în KBr)*

— veratrina bază : A (1 270), B (1 085), C (1 111).

II.5.18. SOLANINA ȘI SOLANIDINA

Solanina (solatunina), glicoalcaloid prezent în diferite specii de solanum (solanacee), este formată din trei molecule de glucide (glucoză, galactoză, manoză), legate de agliconul solanidină (solatubină) :



A. **Izolare**

Solanina și solanidina se izolează din mediu alcalin cu solvenți organici, preferabil cu alcool anilic.

a) *Izolare din cartofi* (tehnica Neguț și colaboratorii) : se cîntăresc 50 g cartofi curățați de coajă (sau piureu de cartofi), se mărunțesc, se majorează

Scanned with OKEN Scanner

și se aduc cantitativ într-un balon cu dop rodat de 500 ml. Se adaugă 150 ml alcool amilic alcalinizat (pH 11), se agită cu un agitator mecanic timp de 30 minute. Se lasă în repaus 15 minute, apoi se decantează supernatantul. Reziduul din balon se spală de două ori cu cîte 25 ml alcool amilic, adăugînd lichidele de spălare la supernatant. Extractul în alcool amilic alcalinizat este concentrat pînă la 5 ml pe baia de apă, sub vid sau la un evaporator rotativ sub vid. Extragerea alcaloizilor din proba de cartofi mojarată poate fi realizată și la aparatul Soxhlet cu alcool amilic alcalinizat, iar extractul este concentrat sub vid. În paralel se execută o probă martor din cartofi necloro-filizați, albi, cu gust normal.

B. **Identificare**

1. *Reacție de culoare*

Se adaugă la 1 ml concentrat, 2 ml reactiv paraformaldehidă-acid fosforic. Se agită 2—5 minute, cînd culoarea galbenă trece, în prezența alcaloizilor, în albastru-cenușiu (culoarea oțelului). În proba martor, executată cu concentrat din cartofi normali, culoarea este galbenă, ușor maronie. Se apreciază colorația din probă, față de martor, intens pozitiv (++++), pozitiv (+++) sau slab pozitiv (++, +).

Reactiv paraformaldehidă-acid fosforic : se dizolvă 1 g paraformaldehidă în acid fosforic 90% și se completează la 100 ml cu acid fosforic. Se păstrează în sticle brune, la frigider.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se spotează 0,2—0,5 ml din amestecul 2 ml concentrat + 1 ml acid acetic 2 N, pe cromatogramă, în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este : amoniac-metanol (1,5 : 100). Timpul de migrare este de o oră.

Revelarea se realizează prin pulverizare cu reactiv iod-tetraclorură de carbon (1 g iod dizolvat în tetraclorură de carbon și adus la 100 ml cu tetraclorură de carbon). Se expune la lumina U.V. ($\lambda = 254$ nm) și se măsoară Rf-urile spoturilor colorate. Teoretic, Rf pentru solanină este 0,52, iar pentru solanidină, 0,68.

Interpretarea rezultatelor

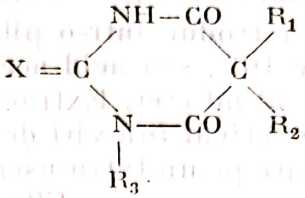
Solanina și solanidina sînt prezente în mod normal în coaja cartofilor maturizați, în proporție de 1%. Cantitatea acestor alcaloizi crește în cartofi încolțiți pînă la 2—4% toamna și iarna și pînă la 10—20% primăvara. Cartofii cu conținut anormal al acestor alcaloizi prezintă culoare verde la suprafața cojii și în zona de lîngă coajă (1—5 mm), precum și gust amar și iute. Cauzele determinante ale creșterii conținutului de solanină și solanidină sînt : administrarea de cantități mari de azot în sol, temperaturi scăzute și insuficiență de apă în perioada vegetației ; efectul unor antidăunători : procesul de biosinteză cînd, alături de clorofilă, se sintetizează și alcaloizii solaninici.

Sînt descrise cazuri de intoxicație prin alimentație cu cartofi verzi încolțiți sau preparate provenite din aceștia, la animale și la om. Doza toxică la om este de 20—25 mg/kg corp.

Scanned with OKEN Scanner

II.6. DETERMINAREA UNOR MEDICAMENTE

II.6.1. DERIVAȚII BARBITURICI



În tabelul 12 sînt prezentați principalii derivați barbiturici.

Tabelul 12

Principalii derivați barbiturici

Denumirea	R_1	R_2	R_3	X
Durată lungă de acțiune (8—12 ore)				
Alobarbital (Dial, Cibalgin)	alil	alil	hidrogen	oxigen
Barbital (Veronal)	etil	etil	hidrogen	oxigen
Fenobarbital (Gardenal, Luminal)	eti	fenil	hidrogen	oxigen
Meforbarbital (Prominal, Meboral)	etil	fenil	metil	oxigen
Metabarbital (Gemonil)	etil	etil	metil	oxigen
Durată medie de acțiune (4—8 ore)				
Amobarbital (Dormital, Amital)	etil	izopentil	hidrogen	oxigen
Aprobarbital (Allonal)	alil	izopropil	hidrogen	oxigen
Butalbital (Sandoptal)	alil	izobutil	hidrogen	oxigen
Butobarbital (Butetal, Neonal)	etil	butil	hidrogen	oxigen
Vinbarbital (Optenex, Delvinal)	etil	1-metil, 1-butenil	hidrogen	oxigen
Durată scurtă de acțiune (2—4 ore)				
Ciclobarbital (Phanedorm, Hypnoval)	etil	1-ciclohexen, 1-il	hidrogen	oxigen
Heptabarbital (Medomine)	etil	1-cicloheptan, 1-il	hidrogen	oxigen
Hexobarbital (Evipan)	metil	1-ciclohexen, 1-il	metil	oxigen
Pentobarbital (Nembutal)	etil	1-metilbutil	hidrogen	oxigen
Secobarbital (Seconal)	alil	1-metilbutil	hidrogen	oxigen
Tiopental (Pentotal)	etil	1-metilbutil	hidrogen	sulf
Durată foarte scurtă de acțiune (30 minute — 2 ore)				
Metohexital (Brevital)	alil	1-metil-2-pentinil	metil	oxigen
Tiamital (Surital)	alil	1-metilbutil	hidrogen	sulf
Tialbarbital (Kemital)	alil	1-ciclohexen, 2-il	hidrogen	sulf

Scanned with OKEN Scanner

A. **Izolare**

Derivații barbiturici sînt insolubilizați în fază apoasă prin acidularea produsului de analizat cu un acid tare, apoi extrași sub formă nedisociată cu solvenți organici (eter, cloroform, diclormetan). Utilizarea acidului tare împiedică extragerea, de către solventul organic, și a alcaloizilor și fenotiazinelor, pe care le salifică, insolubilizîndu-le astfel în solvenții organici.

a) *Izolare din urină :* se introduc într-o pîlnie de separare 25 ml urină, se acidulează cu acid sulfuric 10% sau acid acetic concentrat la pH 4—5 și se extrag de două ori cu cîte 50 ml eter. Extractele eterice reunite sînt purificate prin tratare cu cărbune activat (un vîrf de spatulă) și oxid de magneziu (aproximativ 0,2 g), apoi filtrate pe un filtru uscat pe sulfat de sodiu anhidru. Se spală filtrul cu puțin eter și se evaporă filtratul la sec.

b) *Izolare din sînge :* 1) Se diluează 5 ml sînge total în 50 ml apă distilată. După hemolizare, se acidulează cu acid clorhidric 10% la pH 3—4 și se extrag de două ori cu cîte 50 ml eter. Extractele eterice reunite sînt purificate, filtrate și evaporate la sec, ca la urină. 2) Se acidulează ușor 5 ml sînge total cu acid sulfuric 5% și se extrag de două ori cu cîte 20 ml cloroform sau diclormetan. Extractele organice reunite sînt filtrate pe sulfat de sodiu anhidru și evaporate la sec pe baia de apă. 3. Se tratează 5 ml sînge total cu 30 ml apă distilată și 1 ml hidroxid de sodiu 10%. Se agită și, peste 10 minute, se adaugă 10 ml tungstat de sodiu 10%. Se agită și se adaugă, cu picătura 3,5 ml acid sulfuric 10%. Se încălzește 10 minute pe baia de apă, cînd precipită proteinele. Se filtrează și se aduce la 50 ml cu apă distilată. Se iau 25 ml filtrat și se extrag de două ori cu cîte 50 ml eter, apoi se continuă purificarea, filtrarea și evaporarea la sec, ca la urină.

c) *Izolare din sînge, urină, lichid de spălătură gastrică :* se introduc 10 ml sînge (sau 20 ml urină sau 20 ml lichid de spălătură gastrică) într-un mojar de 500 ml. Se acidulează cu acid clorhidric 10% pînă la reacție net acidă la turnesol. Se adaugă 35 g sulfat de sodiu anhidru în porțiuni mici, triturînd continuu, pînă la obținerea unui amestec pulverulent și uscat. Dacă temperatura laboratorului este ridicată, triturarea și solidificarea amestecului sînt favorizate prin introducerea, în prealabil, a mojarului cu conținutul său, timp de 10 minute, în frigider. Amestecul pulverulent este introdus într-o alonjă de 25 cm lungime și 3 cm diametru interior. Partea îngustată a alonjei este obturată cu un tampon de vată degresată, peste care se aplică, succesiv, cîte un strat de cărbune activat (0,2 g) și, în fine, masa solidă a amestecului de analizat. Se introduc apoi în alonjă 50 ml eter, care extrag derivatul barbituric și neutralizează aciditatea. Impuritățile sînt reținute de cărbunele activat, iar urmele de apă, de Na_2SO_4 anhidru. Eterul cules este evaporat la sec pe baia de apă (fig. 29).

d) *Izolare din organe :* 1) *metoda Grandwohl :* se mojarează 50 g organe în 180 ml apă și 20 ml NaOH 10%. Se tratează, agitînd, cu 120 ml tungstat de sodiu 10% și acid sulfuric 20%, pînă la pH 2—3. Se menține pe baia de apă timp de 20 minute, agitînd periodic, cînd precipită proteinele. Se filtrează în vid prin pîlnie Büchner. Filtratul răcit este extras de două ori cu cîte 100 ml eter, apoi eterul este reluat cu 25 ml hidrogencarbonat de sodiu 5%, care extrag urmele de acid din eter. Se reia eterul cu 10 ml hidroxid de sodiu 10%, care extrag derivații barbiturici. Soluția apoasă, conținînd barbiturații

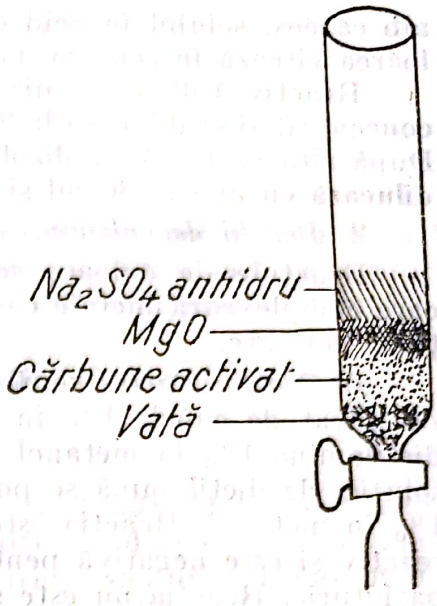


Fig. 29 — Alonjă montată pentru extragerea derivaților barbiturici (metoda Griffon-Le Breton).

alcalini, este reacidulată cu acid sulfuric 10%, pînă la pH 3 și extrasă de două ori cu cîte 25 ml eter. Extractele eterice reunite sînt filtrate pe sulfat de sodiu anhidru și evaporate la sec pe baia de apă. 2) *Metoda Stas-Otto-Ogier :* în cursul operațiilor de extragere generală, derivații barbiturici se regăsesc în lichidul apos acid, de unde sînt extrași cu eter sau cloroform.

e) *Izolare din corpuri delicte (resturi de medicamente etc.) :* produsul de analizat este dizolvat sau suspendat în apă, acidulat cu acid sulfuric 10% și extras cu eter ; apoi se continuă ca la urină.

Indiferent de metoda de extragere, reziduurile obținute după evaporarea solvenților organici pot fi albe, cristaline, sau colorate, din cauza impurităților. În acest ultim caz, reziduurile sînt purificate prin tratare cu 1—2 picături de hidroxid de sodiu 20%, diluare cu apă la 4—5 ml și, la nevoie, filtrare. Filtratul este acidulat și extras din nou cu eter, cloroform, diclormetan.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

Reacțiile de precipitare se bazează pe prezența hidrogenului din grupările NH, care conferă derivatului barbituric caracterul acid și, deci, posibilitatea precipitării lui.

a) *Reacția Dènigés :* se dizolvă reziduul într-o picătură de acid sulfuric concentrat și se diluează cu 1—2 picături de apă, cînd apare un precipitat amorf, care cristalizează în timp cu forme caracteristice fiecărui derivat barbituric, permițînd identificarea microcristalină. Astfel, barbitalul cristalizează în prisme dreptunghiulare, fenobrabitalul în ace grupate sferoid, hexobarbitalul în ramuri neregulate etc.

b) *Reacția Millon :* se dizolvă reziduul în cîteva picături de hidroxid de sodiu 1% și se adaugă 0,5 ml reactiv Millon, cînd se obține un precipitat

alb cazeos, solubil în acid clorhidric 10% și în clorură de sodiu 10%; culoarea virează în cenușiu datorită reducerii Hg^+ la Hg metalic.

Reactiv Millon: se dizolvă 10 g nitrat mercuros în 8,5 ml acid azotic concentrat și se diluează la 20 ml cu apă, apoi se decantează lichidul limpede. După altă variantă, se dizolvă 10 g mercur metalic în 15 ml HNO_3 conc. se diluează cu apă la 30 ml și se decantează lichidul limpede.

2. *Reacții de culoare*

Reacțiile de culoare se bazează pe prezența grupării CO—NH—CO, care complexează metale ca Hg, Co, Cu, cu apariția precipitatelor sau soluțiilor colorate.

a) *Reacția Parri:* se dizolvă reziduul în metanol, se adaugă o picătură de nitrat de cobalt 1% în metanol și se alcalinizează cu 1—2 picături de dietilamină 1% în metanol, cînd apare o coloratie violet-ciclamen. În locul soluției de dietilamină se poate folosi, pentru alcalinizare, hidroxid de litiu 1% în metanol. Reacția este împiedicată de prezența apei și de excesul de reactiv și este negativă pentru metaboliții formați prin deschiderea ciclului barbituric. Reacția nu este sensibilă și nici specifică, fiind dată și de glutetimidă, hidantoine etc.

b) *Reacția Zwicker—Ioanid-Mihăilescu:* se tratează reziduul sau soluția apoasă cu reactiv Zwicker, cînd apare un precipitat violet, de forma $Barb._2CuPy_2$, solubil în cloroform. Mecanismul este următorul: în mediul apos conținînd piridină, are loc enolizarea și ionizarea parțială a derivatului barbituric, care reacționează cu ionul complex $[CuPy_2]^{2+}SO_4^{2-}$, dînd complexul violet $Barb._2CuPy_2$. În varianta Ioanid-Mihăilescu, precipitatul este albastru-violet și se obține și cu derivații barbiturici N-substituiți.

Reactiv Zwicker: soluție de sulfat de cupru 10% 4 ml, piridină 1 ml, apă 5 ml.

Reactiv Ioanid-Mihăilescu: se dizolvă 5 g sulfat de cupru amoniacal proaspăt preparat într-un amestec de 90 ml apă, 50 ml amoniac 10% și 5 m piridină.

3. *Cromatografie în strat subțire (C.S.S.)*

Prepararea cromatoplăcilor: se spală plăcile de sticlă de dimensiunea 9 × 15 cm, se usucă și se degresează cu eter sau acetonă. Se amestecă într-un mojar 12 g silicagel G cu 30 ml apă distilată. Se aplică amestecul în strat uniform pe plăci, se lasă 10—15 minute la temperatura laboratorului, apoi se introduc în etuvă pentru activare, timp de o oră la 105°C. Ss pot folosi, cu bune rezultate, în locul plăcilor de sticlă, folii de aluminiu (alufolii) livrate de diferite firme.

Spotarea: se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml metanol și se aplică cu o pipetă Pasteur, pe cromatoplacă, spoturi de maximum 5 mm diametru, la o distanță de 2 cm de marginea inferioară a plăcii. Alături, se aplică spoturi de soluții martor. Se lasă placa să se usuce.

Migrarea: se introduce placa într-un bac de cromatografie conținînd unul din următoarele sisteme de migrare:

— cloroform: acetonă (9 : 1)

— benzen : acetonă : amoniac (5 : 5 : 0,2)
— cloroform : izopropanol : acetonă (5 : 5 : 1)
— cloroform : benzen (1 : 1)
— cloroform : izopropanol : amoniac (5 : 5 : 1)
— n. butanol : amoniac (5 : 1)
— acid acetic glacial : benzen (1 : 9)

Se lasă să migreze aproximativ 10 cm de la linia de spotare (sau pînă la 1 cm de la marginea superioară a plăcii). Se scoate placa și se lasă să se usuce. Timpul de migrare variază, în raport cu sistemul de migrare, între 10 și 60 minute.

Revelarea : se pulverizează placa cu unul din următorii reactivi :

— sulfat mercuric 1% : spot alb ;

— azotat mercuros 1% : spot negru ;

— reactiv Parri (nitrat de cobalt 1% în acetonă). După pulverizare, se usucă placa și se expune la vapori de amoniac, cînd apar spoturi violete, atît pentru barbiturice, cît și pentru tiobarbiturice. Spoturile dispar în timp și reapar la o nouă expunere la vapori de amoniac. Sensibilitatea reacției este de 50 μg/spot ;

— amestec de 8 ml soluție apoasă de azotat de argint 5%, 2 ml soluție de rodamină B 0,2%, și 2 ml metanol, spot roz-violaceu ;

— reactiv Zwicker : spot violaceu ;

— complex cupru-dietilamină (amestec de părți egale de dietilamină 10% în metanol și sulfat de cupru, soluție saturată în metanol) ; derivații tiobarbiturici sînt puși în evidență prin spoturi galbene. Dacă se usucă placa la 80°C și se expune la vapori de amoniac, spoturile date de derivații tiobarbiturici apar roșii, iar cele date de derivații barbiturici, violete ;

— azotat de argint amoniacal (amestec de părți egale de amoniac 5% și azotat de argint 1%, preparat extemporaneu) : derivații tiobarbiturici reduc reactivul, cu formare de spoturi negre pe fond alb sau cenușiu ;

— permanganat de potasiu 1% : derivații barbiturici care conțin radicali nesaturați decolorează permanganatul de potasiu, obținîndu-se spoturi albe pe fond roz ;

— dimetilamină-clorură mercurică-difenilcarbazonă : se pulverizează cu dietilamină, apoi cu reactivul următor, preparat extemporaneu : 1 volum soluție $HgCl_2$ 2% în etanol de 95°C și 1 volum soluție de difenilcarbazonă 0,05% în cloroform. Reactivul trebuie să fie roz. Dacă este portocaliu, se adaugă, cu picătura, apă distilată, iar dacă este violet, se adaugă, cu picătura, acid clorhidric 10%, pînă la aducerea la culoarea roz. Spoturile sînt : violete pentru derivații barbiturici (cu excepția hexobarbitalului și tiobarbitalului, care nu dau colorații cu acest reactiv), roz sau albastre pentru carbamați și albastre-închis pentru glutetimidă.

4. *Spectrofotometrie în I.R.*
(v. tabelul 13)

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (reacția Parri)*

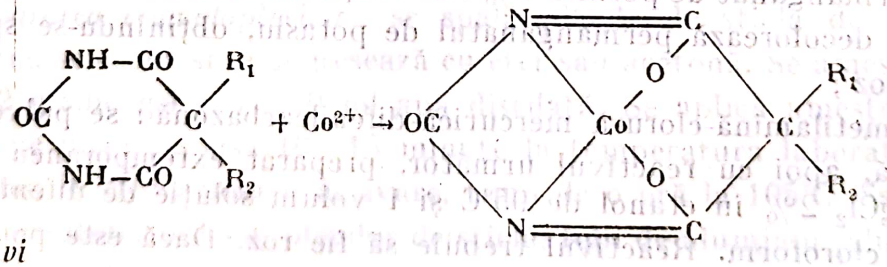
Principiu

Derivații barbiturici formează în mediu anhidru, cu azotatul de cobalt, la pH alcalin, un complex intern colorat în violet. Sensibilitatea reacției este de 100 μg/ml.

Tabelul 13

Valorile absorbțiilor maxime în I.R. ale unor barbiturice (după Clarke)

Derivatul barbituric	*I.R.*		
	A	*B*	*C*
Alobarbital	1 687	1 375	1 437
Barbital	1 674	1 754	1 380, 1 707
Fenobarbital	1 703, 1 756	1 406	
Mefobarbital	1 684, 1 707	1 365	
Metabarbital	1 655, 1 699	1 326	
Amobarbital	1 716	1 689	1 745
Aprobarbital	1 689, 1 715	1 439	1 376
Butalbital	1 688, 1 716	1 428, 1 740	
Butobarbital	1 683, 1 712, 1 745		
Vinbarbital	1 370, 1 675, 1 760		
Ciclobarbital	1 693	1 725	1 430
Hexobarbital	1 660, 1 712	1 358, 1 390	
Pentobarbital	1 685	1 719	1 744
Secobarbital	1 559	1 648	1 690
Tiopental	1 484	1 409	1 688
Tioalbarbital	1 482	1 685	1 409



Reactivi

1. Azotat de cobalt 1% în metanol ; 2. Amoniac concentrat ; 3. Soluție standard : se cîntăresc 0,5000 g fenobarbital și se aduc cu apă la 100 ml (1 ml = 5 mg).

Modul de lucru

Se dizolvă reziduul în 2 ml metanol. Se trece cantitativ soluția într-o eprubetă gradată și se aduce la 4 ml cu metanol. Din această soluție se iau 2 ml și se tratează cu 2 picături soluție azotat de cobalt și 2 picături amoniac.

Se citește extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 565$ nm, în cuvă de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 0,1 și 5 mg/probă (0,05—1 ml soluție standard completat la 2 ml cu metanol). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 2 (pentru că s-a lucrat cu 1/2 din probă) obținîndu-se concentrația C a derivatului barbituric, în mg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sînge sau mg/litru urină :

$$\text{mg derivat barbituric/100 ml sînge} = \frac{C \times 100}{A}$$

$$\text{mg derivat barbituric/litru urină} = \frac{C \times 1\,000}{A}$$

în care :

C = concentrația derivatului barbituric, în mg ;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică în U.V. (tehnica Bourdon-Yonger)*

Principiu

Soluțiile apoase de derivați barbiturici extrase cu diclormetan din mediu acid sînt aduse la pH 10,5 și 13. În soluția cu pH 10,5 absorbția în U.V. corespunde formei monoionizate și prezintă un maximum la 238 nm. În soluția cu pH 13, absorbția corespunde formei diionizate și prezintă un maximum la 260 nm. La 250 nm, absorbția ambelor soluții este asemănătoare. Derivații barbiturici sînt dozați cu ajutorul variațiilor de extincție a soluțiilor cu pH 10,5 și 13, la $\lambda = 260, 250, 238$ nm.

Reactivi

1. Acid clorhidric 10%. 2. Diclormetan. 3. Hidroxid de sodiu, soluție 0,45 N. 4. Tampon fosfat pH 7,4. Se prepară din 19,2 ml soluție A și 80,8 ml soluție B. Soluție A : fosfat monopotasic M/15 (9,978 g KH_2PO_4, apă distilată ad 1 000 ml). Soluție B : fosfat disodic M/15 (11,876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$, apă distilată ad 1 000 ml). 5. Clorură de amoniu, soluție 16%. 6. Soluție standard de fenobarbital. Se aduc 50 mg fenobarbital în 5 ml apă, se adaugă 1—2 ml NaOH 0,1 N pentru dizolvare, se agită și se completează la 100 ml cu apă (1 ml = 500 μg fenobarbital).

Modul de lucru

În două pîlnii de separare de 200 ml, A_1 și B_1, se introduce lichidul biologic de analizat și următorii reactivi :

		A_1	B_1
ser, urină	ml	2	2
soluție standard de fenobarbital	ml	—	0,2
acid clorhidric 10	ml	0,2	0,2
		se omogenizează	
diclormetan	ml	40	40

Se agită puternic 3 minute, continuu, se lasă în repaus 5 minute, se filtrează fazele organice (inferioare) pe cîte un filtru dublu, direct în două pîlnii de separare de 200 ml, A_2 și B_2, conținînd cîte 4 ml NaOH 0,45 N. Fazele apoase acide rămase în pîlniile A_1 și B_1 sînt extrase din nou cu cîte 40 ml diclormetan (agitare 3 minute, repaus 5 minute). Fazele organice (inferioare) sînt trecute tot în pîlniile A_2 și B_2. Acestea se agită 3 minute continuu și se lasă în repaus 5 minute. Fazele organice (inferioare) sînt trecute în două pîlnii, A_3 și B_3, conținînd cîte 4 ml NaOH 0,45 N. Se agită 3 minute continuu, se lasă în repaus 5 minute. Se elimină fazele organice (inferioare). În două eprubete de centrifugă, A_4 și B_4, se culeg fazele apoase alcaline din $A_2 + A_3$ (în eprubeta A_4) și din $B_2 + B_3$ (în eprubeta B_4). Se centrifughează la viteză mare timp de 3 minute, pentru a se separa și urmele de diclormetan. Soluțiile alcaline A_4 și B_4 sînt supuse spectrofotometrării.

Se iau două eprubete, 1 și 2. În eprubeta 1 se introduc 3 ml din faza apoasă alcalină A_4 și se adaugă 0,5 ml NaOH 0,45 N (pH 13). În eprubeta 2 se introduc 3 ml din faza apoasă alcalină B_4 și se adaugă 0,5 ml NH_4Cl 16% (pH 10,5). Se execută, în cuva de cuarț de 1 cm, măsurători la următoarele lungimi de undă :

— 260 nm, soluția din eprubeta 1 (pH 13), reglînd aparatul la zero cu soluția din eprubeta 2 (pH 10,5), obținîndu-se extincția E_1 ;

— 250 nm, soluția din eprubeta 1 (pH 13), reglînd aparatul la zero cu soluția din eprubeta 2 (pH 10,5), obținîndu-se E_2 ;

— 230 nm, soluția din eprubeta 2 (pH 10,5), reglînd aparatul la zero cu soluția din eprubeta 1 (pH 13), obținînd E_3.

Valoarea E_3 este puțin mai mică decît E_1. E_2 este mult scăzută față de E_1 și E_3. Se execută aceleași măsurători cu soluția B_4, obținîndu-se extincțiile E_1', E_2' și E_3'.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg derivat barbituric (fenobarbital) la litru de lichid biologic (sînge, urină, alte lichide biologice) :

$$\text{mg fenobarbital/litru lichid biologic} = 50 \times \frac{E_1}{E_1' - E_1}$$

în care :

E_1 = extincția la 260 nm pentru lichidul biologic al subiectului ;

E_1' = extincția la 260 nm pentru lichidul biologic al subiectului la care s-a adăugat fenobarbital (50 mg/litru).

Exemplu de calcul

Pentru serul unui intoxicat s-au găsit :

$E_1 = 0{,}290$ $E_2 = 0{,}050$ $E_3 = 0{,}215$

Pentru serul intoxicatului, la care s-au adăugat 50 mg/litru fenobarbital, s-au găsit :

$$E_1' = 0{,}458 \qquad E_2' = 0{,}090 \qquad E_3' = 0{,}355$$

$$\text{mg fenobarbital/litru aer} = 50 \frac{0{,}290}{0{,}458 - 0{,}290} = 86$$

Observații

1. Metoda se pretează numai la determinarea derivaților barbiturici nesubstituiți la azot, deoarece la derivații N-substituiți nu poate avea loc a doua ionizare. 2. Se poate lucra și cu 0,1 ml sînge, 0,1 ml soluție standard și 0,1 ml HCl 10%. 3. La barbitemii peste 3—4 mg/100 ml sînge se identifică tipul de derivat barbituric, apoi se poate relua dozarea, utilizînd ca adaus la serul intoxicatului, derivatul barbituric identificat. 4. Sulfamidele cu gruparea SO_2NH_2 liberă interferă în determinare, făcînd-o inaplicabilă. Prezența lor este evidențiată prin faptul că extincția la 250 nm este mai mare decît extincția la 260 nm. 5. În prezența salicilemiei se poate doza barbitemia dacă se spală faza organică, în pîlniile A_2 și B_2, cu cîte 10 ml soluție tampon fosfat. Este necesară deci, în prealabil, identificarea în urină a salicilaților și apoi dozarea salicilemiei. Spălarea fazei organice cu soluție tampon fosfat se efectuează întotdeauna cînd E_2 este mai mare decît E_1 și E_3. 6. Hidantoinele și glutetimida nu deranjează determinarea calitativă prin această metodă în U.V.

3. *Metoda spectrofotometrică în U.V.*

Principiu

Derivații barbiturici prezintă un spectru de absorbție în U.V. specific moleculei malonilureei (datorită formei enolice a ciclului) și aproape independent de catenele laterale. Deoarece ionizarea este funcție de pH, spectrul de absorbție prezintă mai multe maxime. În mediu slab acid și slab alcalin (pînă la pH 7,6), derivații barbiturici nu sînt ionizați, astfel încît absorbția în U.V. este neglijabilă pe porțiunea care interesează : 220—270 nm. În mediu alcalin (pH 10), derivații barbiturici suferă ionizare în două trepte (datorită celor două grupări cetonice) și prezintă o absorbție minimă la 235 nm și o absorbție maximă la 255 nm. Sensibilitatea metodei este de 1—2 μg/m soluție.

Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 10%. 2. Tungstat de sodiu 10%. 3. Acid sulfuric 10% (v/v). 4. Hidroxid de amoniu 0,1 N. 5. Cloroform.

Modul de lucru

Într-un pahar Berzelius se iau 30,5 ml apă distilată și 5 ml sînge total. Se adaugă, cu o pipetă, 1 ml NaOH 10%, cu picătura, agitînd continuu și 10 ml tungstat de sodiu 10% în porțiuni mici și agitînd continuu. Se agită cu o baghetă, astfel încît masa întreagă să fie bine omogenizată și se adaugă 3,5 ml acid sulfuric 10%, cu picătura, agitînd continuu. Se menține paharul Berzelius pe baia de apă, la fierbere, timp de 10 minute. Se filtrează pe filtru uscat într-un cilindru gradat și se notează volumul filtratului. Se extrage

Scanned with OKEN Scanner

filtratul într-o pîlnie de separare cu 50 ml cloroform, se separă faza cloroformică și se extrage cu 10 ml NH_4OH 0,1 N.

Se spectrofotometrează faza amoniacală (pH 10) la 240 mn (E_1) apoi se acidulează faza amoniacală cu acid sulfuric 10%, cu picătura, pînă la pH 2 și se spectrofotometrează din nou la 240 nm^2 (E_2). Ambele citiri se fac față de o probă oarbă de NH_4OH. Diferența de extincție E dintre cele două extincții, E_1 și E_2, corespunzătoare celor două pH-uri, este raportată la o scară etalon, preparată în condiții identice cu proba, cu concentrații de 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml.

Calcul

Dacă, de exemplu, E = 0,27 corespunde, pe curba etalon la 7,5 micrograme și s-au culeș 38 ml filtrat, se calculează astfel :

7,5 µg × 10 (ml NH_4OH) = 75 µg (conținuți în 38 ml filtrat) ;

50 ml filtrat (corespunzînd la 5 ml sînge) conțin 75 × 50/38 = 98 µg ;

100 ml sînge conțin 98 × 100/5 = 1972 µg = 1,97 mg.

Interpretarea rezultatelor

1. După doze terapeutice, barbitemia are valori în jur de 1 mg/100 ml sînge. 2. În intoxicațiile grave, cu stare comatoasă, se găsesc următoarele valori pentru barbitemie : 3—5 sau chiar 8 mg /100 ml sînge pentru barbituricele cu durată scurtă de acțiune și 10—15 mg/100 ml sînge pentru barbituricele cu durată lungă de acțiune. 3. Există o corespondență între barbitemie și gravitatea comei barbiturice (tabelul 14). 4. Dacă barbitemia depășește 3—4 mg/100 ml sînge, se impune identificarea tipului de derivat barbituric, pentru a stabili conduita terapeutică ulterioară. 5. Se apreciază că absorbția de 6—8 g fenobarbital conduce la o barbitemie de 15 mg/100 ml sînge, iar de 20 g barbital, la 30 mg/100 ml sînge. 6. Eliminarea urinară nu se intensifică decît la cîteva ore de la absorbție, iar pH-ul urinar influențează mult barbituria. De aceea, se preferă dozarea barbitemiei, care exprimă mai fidel gravitatea reală a intoxicației. 7. Concentrațiile urinare cresc în timpul tratamentului din intoxicația acută, atingînd uneori valori de 300 mg/litru urină ; în special eliminarea urinară a barbitalului este crescută, ajungînd la peste 500 mg/litru urină.

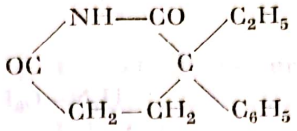
Tabel 14

Corelația dintre barbitemie și stadiul comei (după Fréjaville)

Stadiul comei	*Barbitemia mg/100 ml sînge*		
	Fenobarbital	*Butobarbital*	*Pentobarbital*
Stadiul I	6	3	2
Stadiul II	7	5	2
Stadiul III	10	6	3
Stadiul IV	14	7	4

Scanned with OKEN Scanner

II.6.2. GLUTETIMIDA



A. **Izolare**

Glutetimida (Noxiron) se izolează din produse biologice (urină, sînge, organe) și corpuri delicte prin extragere cu cloroform sau eter de petrol din mediu neutru sau slab acid.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare și fluorescența*

a) Se reia reziduul cu cloroform, se adaugă 2 picături de acetat de cobalt 1% în metanol și 2—3 picături de hidroxid de litiu 1% în metanol, cînd apare o culoare albastră, care virează rapid la albastru-verde, apoi la verde.

b) Cu *reactivul Liebermann* se obține o colorație portocalie. Reactivul Liebermann: se aduc 10 g nitrit de potasiu cu acid sulfuric concentrat la 100 ml.

c) Se tratează reziduul cu 1 ml *reactiv sulfoformolat (reactiv Marquis).* Se ușurează dizolvarea prin raclarea reziduului cu o baghetă de sticlă. Se examinează la 366 nm. În prezența glutetimidei se observă o fluorescență galbenă-roz, care se intensifică dacă se încălzește soluția cîteva minute la 100°C, pe baia de apă.

d) Se adaugă 10 ml apă, se agită și se transvazează lichidul într-o eprubetă. După un minut, se observă lichidul în lumina ultravioletă. În prezența glutetimidei, se observă fluorescență verde în partea inferioară a lichidului și o fluorescență albastră intensă, sub formă de inel, la partea superioară.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în cîteva picături de cloroform sau metanol. Sistemele de migrare sînt: benzen : acid acetic glacial (9 : 1); cloroform : acetonă (9 : 1); benzen : amoniac : metanol (1,5 : 100); dioxan : benzen : amoniac (4 : 15 : 1). Revelarea se realizează prin pulverizare cu: permanganat de potasiu 0,2%; azotat mercuros, soluție saturată; iodoplatinat acidulat (v. Morfina); dietilamină-clorură mercurică-difenilcarbazonă (v. Derivații barbiturici).

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

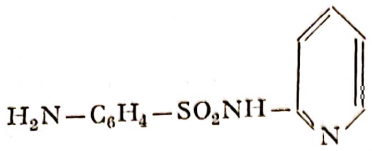
— glutetimida în: etanol (251, 257, 263); NaOH 0,5 N (235); în acest ultim caz, determinarea trebuie efectuată rapid (90 secunde) după obținerea soluției alcaline, datorită hidrolizei ciclului piperidinic în mediu alcalin.

b) *I.R. (în KBr)*

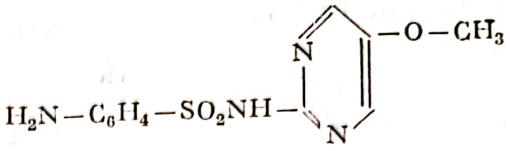
— glutetimida: A (1686), B (1 710), C (1 200).

Scanned with OKEN Scanner

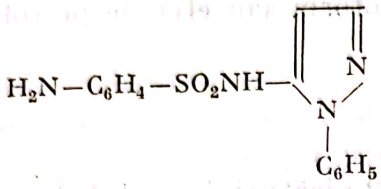
II.6.3. SULFAMIDELE ANTIBACTERIENE



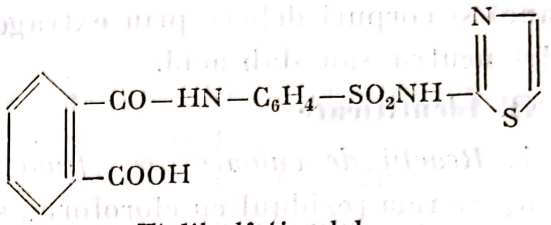
Sulfapiridina
(Sulfidina)



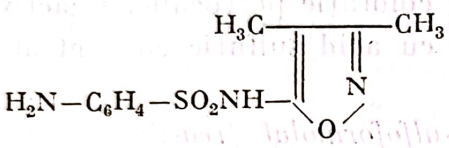
Sulfametoxidiazina
(Sulfametina)



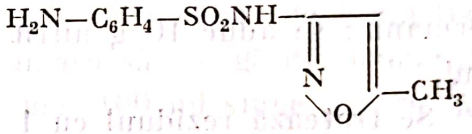
Sulfafenazolul



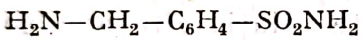
Ftalilsulfatiazolul
(Ftalazolul, Talazolul,
Talilsulfazolul)



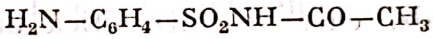
Sulfafurazolul
(Sulfizoxazolul)



Sulfametoxazolul



Homosulfamida
(Marfanilul)



Sulfacetamida

A. Izolare

Sulfamidele se izolează din lichidul apos acid cu eter. Adăugarea unui volum egal de acetonă la lichidul apos, înainte de extragerea cu eter, favorizează extragerea.

B. Identificare

1. *Reacție de culoare*

a) *Reacția de diazotare și cuplare*: se tratează 2 ml urină cu 1 ml acid clorhidric 10%, se agită și se adaugă 5 picături de soluție de nitrit de sodiu 10% (proaspăt preparată). Se agită și se adaugă 5 ml reactiv betanaftol, cînd apare o culoare galbenă pînă la roșu închis.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acid acetic sau acetonă și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Pentru majoritatea sulfamidelor sistemul de revelare este amoniac : metanol (1,5 : 100). Alte sulfamide migrează în sistemul cloroform : etanol : heptan (1 : 1 : 1) sau etanol : metanol (1 : 1).

Revelarea se realizează prin : diazotare urmată de pulverizare cu betanaftol (betanaftol 4% în NaOH 2 N), diazotare urmată de pulverizare cu N-naftiletilendiamină (0,1 g N-naftiletilendiamină clorhidrică în 100 ml etanol) sau expunere în lumina U.V. (254 nm).

Scanned with OKEN Scanner

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(tabelul 15)

Tabelul 15

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale unor sulfamide (după Clarke)

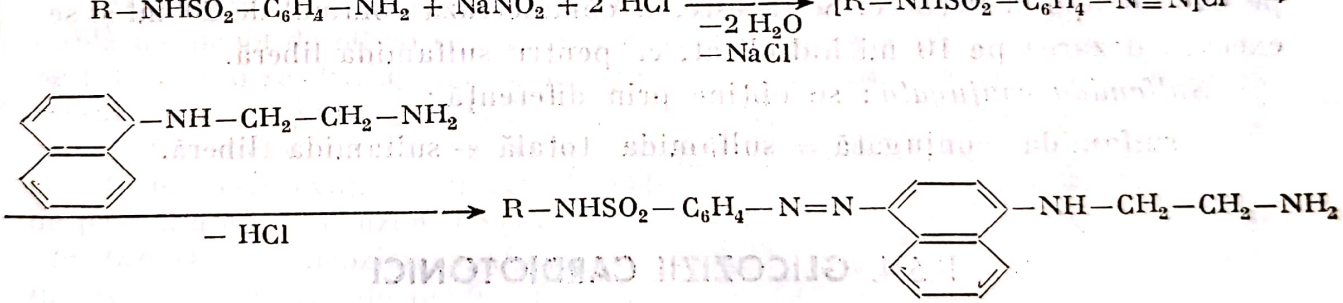
Sulfamida	*U.V. (maxime)*					*I.R. (în KBr)*		
	Apă	*Metanol*	*Etanol*	*HCl 0,01 N*	*NaOH 0,01 N*	*A*	*B*	*C*
Sulfapiridina	244 261		270					
Sulfafenazolul		267				1 148	1 313 1 507	1 592
Ftalilsulfatiazolul			260 291					
Sulfafurazolul				268	253			
Homosulfamida				267				
Sulfacetamida						1 145	1 264	1 552

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică (reacție Bratton-Marshall)*

Principiu

Sulfamida este diazotată în mediu acid și apoi cuplată cu N-naftiletilendiamina, iar azoderivatul rezultat este fotometrat.



Reactivi

1. Acid tricloracetic 15% ; 2. Nitrit de sodiu 0,1% (soluția se conservă maximum 5 zile) ; 3. Sulfamat de amoniu 0,5% ; 4. N-naftiletilendiamină 0,1% (soluția se conservă maximum 5 zile) ; 5. Acid clorhidric 4 N (aproximativ 10%) ; 6. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1 000 g sulfamidă și se aduc la 100 ml cu apă (1 ml = 1 mg) ; 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1/100 (1 ml = 10 μg).

Modul de lucru

a) *Urina. Sulfamida liberă* : se diluează urina de 10, 20, 50 sau 100 ori, după concentrația de sulfamidă presupusă în urma determinării calitative. Se iau : 8 ml urină diluată, 2 ml acid tricloracetic, 1 ml nitrit de sodiu, se agită și se lasă 3 minute în repaus. Se adaugă 1 ml sulfamat, agitîndu-se puternic timp de 3 minute, apoi 1 ml N-fantiletilendiamină (NED). Se agită și se lasă

la întuneric 5—15 minute. Se citește extincția la spectrofotometru, la λ = 550 nm în cuvă de 1 cm față de o probă oarbă. Curba de etalonare se întocmește între 5 și 50 μg/probă (0,5—5 ml soluție standard de lucru, completată la 8 ml cu apă). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se face corecția pentru diluție, obținîndu-se concentrația C a sulfamidei în μg/ml. Rezultatele se exprimă în mg/litru urină.

Sulfamida totală (liberă și conjugată): se execută hidroliza, luîndu-se într-o eprubetă 2 ml urină, 0,5 ml acid clorhidric 4 N și 1 ml apă. Se menține 30 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește, se diluează urina, se diazotează și se cuplează ca mai sus.

Sulfamida conjugată: se obține prin diferență:

sulfamida conjugată = sulfamida totală — sulfamida liberă.

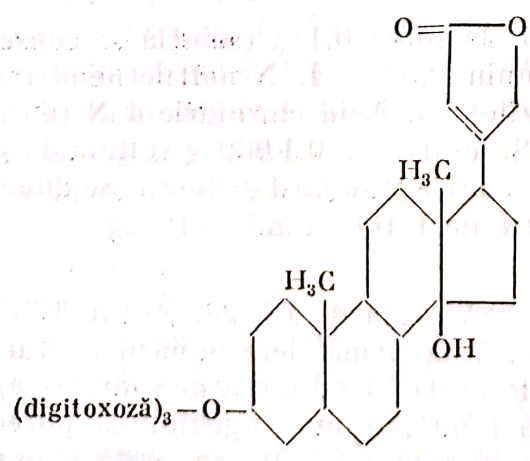
b) *Sînge. Sulfamida liberă*: se hemolizează 2 ml sînge total (recoltat pe oxalat de potasiu) în 30 ml apă, se amestecă și după 5 minute se introduc 8 ml acid tricloracetic, se agită și după 5 minute se filtrează. Din filtrat se iau 10 ml, se adaugă 1 ml nitrit, se agită și după 3 minute se adaugă 1 ml sulfamat. Se agită și după 3 minute se adaugă 1 ml NED și se lasă la întuneric 5—15′. Se citește extincția, se raportează la curba etalon și se calculează în condițiile de mai sus. Dacă concentrația în sulfamidă este inferioară valorii de 1 mg/100 ml se face o diluție de numai 1/10, luînd 4 ml sînge, 28 ml apă și 8 ml acid tricloracetic. Dacă concentrația este superioară valorii de 10 mg/100 ml, se diluează de 2 ori sau de 5 ori filtratul de 1/20.

Sulfamida totală (liberă și conjugată): se execută hidroliza, luîndu-se într-o eprubetă 20 ml filtrat și 1 ml acid clorhidric 4 N. Se menține 30 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește, se completează volumul de 20 ml și se execută dozarea pe 10 ml hidrolizat, ca pentru sulfamida liberă.

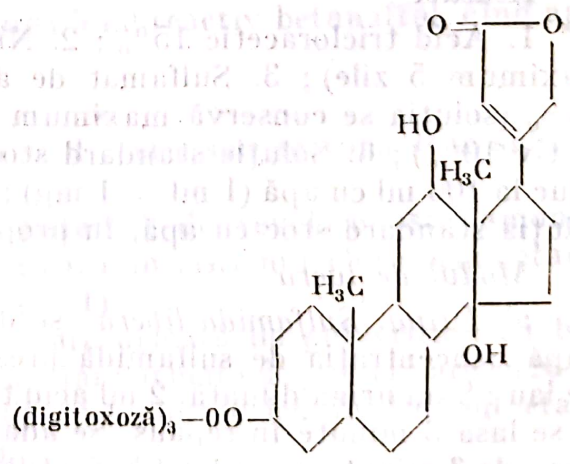
Sulfamida conjugată: se obține prin diferență:

sulfamida conjugată = sulfamida totală — sulfamida liberă.

II.6.4. GLICOZIZII CARDIOTONICI

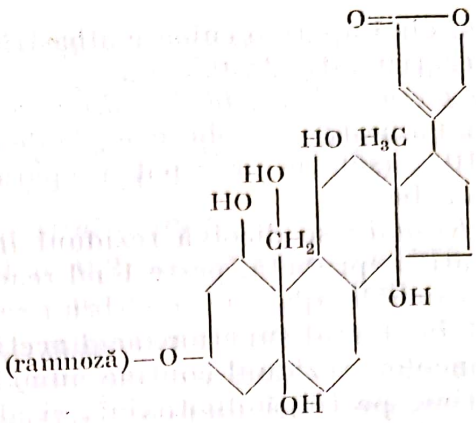


Digitoxina



Digoxina

Scanned with OKEN Scanner



Ouabaină (Strofantina G)

A. **Izolare**

Glicozizii cardiotonici se izolează (din vomă, spălătură gastrică, sînge, urină, organe, corpuri delicte) din mediu acid prin extragere cu solvenți organici. Evaporarea se face la o temperatură sub 50°C, pentru a se evita hidroliza.

a) *Izolare din vomă și spălătură gastrică*: se tratează 50 ml spălătură gastrică sau filtratul provenit din 10 ml vomă și 20 ml apă, cu 1 ml acid sulfuric 10%. Se extrage de două ori cu cîte 50 ml eter (cloroform sau amestec acetat de etil : cloroform 1 : 2) Extractele organice reunite sînt evaporate la sec.

b) *Izolare din urină și sînge* : se acidulează 25 ml urină sau 5—10 ml sînge cu acid clorhidric. Se extrage de două ori cu cîte 50 ml diclormetan. Extractele organice reunite sînt spălate cu apă și amoniac, apoi filtrate peste Na_2SO_4 anhidru și evaporate la sec.

c) *Izolare din organe*: 1. *Metoda Lafon*: se tratează organele cu o cantitate dublă de alcool de 80° și se macerează la 50°C pe baia de apă timp de 4 ore. Se filtrează și se distilează alcoolul în vid. Se filtrează și se deproteinizează cu acetat bazic de plumb soluție 20%. Se filtrează și se elimină excesul de plumb cu sulfat de sodiu. Se filtrează și se epuizează filtratul cu cloroform. Extractul cloroformic este evaporat la sec. Reziduul este purificat prin reluare cu eter de petrol, apoi cu benzen. Extractul benzenic este evaporat la sec. 2. *Metoda Stas-Otto-Ogier* : glicozizii cardiotonici se regăsesc în lichidul apos acid purificat în prealabil cu eter de petrol. Extragerea se face cu cloroform.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) *Identificare rapidă din vomă*: 1. Se tratează 10 ml vomă filtrată cu 1 ml acid sulfuric concentrat și 1 ml apă de brom, cînd digitoxina dă o culoare verde care persistă prin adaus de apă de brom, spre deosebire de strofantină, care se decolorează la adaus de brom. 2. Se tratează 10 ml vomă filtrată cu 1 ml acid sulfuric concentrat, cînd se obține, în prezența digitoxinei, o culoare verde.

b) *Identificare rapidă din extract organic* : se depun pe o hîrtie de filtru, 2—3 picături din extractul organic. Se evaporă solventul și se adaugă 1—2 picături meta-dinitrobenzen, soluție 1% în benzen. După uscare la căldură moderată, se adaugă o picătură din soluția preparată din 6 g NaOH + 45 ml

cloroform + 25 ml apă, cînd apare o culoare albastră-violetă, care dispare în timp. Sensibilitatea reacției este de 0,5 μg.

c) *Reacția cu acid picric și hidroxid de sodiu* : se tratează reziduul reluat în cîțiva ml apă, cu 1 ml amestec în volume egale de acid picric 1% în etanol și hidroxid de sodiu 10% (soluție proaspăt preparată), cînd se dezvoltă o culoare roșie sau portocalie.

d) *Reacția Keller-Kiliani* : se dizolvă reziduul în 1 ml reactiv Keller și se suprapune lichidul, într-o eprubetă, peste 1 ml reactiv Kiliani, cînd la zona de contact a celor două lichide apare un inel brun care trece în albastru, iar coloratia difuzează lent în stratul superior (acid acetic). Dacă stratul inferior (acid sulfuric) rămîne incolor, reziduul conține numai digotoxină, iar dacă se colorează în roșu, conține, pe lîngă digitoxină, și alți glicozizi cardiotonici.

Reactiv Keller : la 100 ml acid acetic glacial se adaugă 1 ml soluție apoasă de sulfat feric 5%.

Reactiv Kiliani : la 100 ml acid sulfuric concentrat se adaugă 1 ml soluție apoasă de sulfat feric 5%.

e) *Reacția Lafon* ; se umectează reziduul cu cîteva picături dintr-un amestec în volume egale de acid sulfuric concentrat și etanol și se adaugă o picătură de clorură ferică 1%, cînd apare o culoare verde-albastră, persistentă.

f) *Reacția Legal* : se dizolvă reziduul în etanol și se tratează 1 ml din soluția rezultată cu 4—5 picături de soluție alcoolică de nitroprusiat de sodiu 5%. După alcalinizare apare o culoare roșie, caracteristică nucleului sterolic.

g) *Reacția cu metadinitrobenzen* : reziduul tratat cu 0,2—0,5 ml reactiv metadinitrobenzen dezvoltă o culoare albastră în prezența digoxinei și roșie în prezența digitoxinei.

Reactiv metadinitrobenzen : soluția A : se dizolvă 0,5 ml hidroxid de tetrametilamoniu 10% în 70 ml alcool absolut. Soluția B : se dizolvă 5 g metadinitrobenzen în 100 ml benzen. În momentul întrebuințării se amestecă 2 volume soluție A cu 3 volume soluție B.

h) *Reacția cu acid 3,5-dinitrobenzoic* : se dizolvă reziduul în 1 ml apă, se adaugă 1 ml acid 3,5-dinitrobenzoic 2% în etanol, 2 ml etanol și 2 ml hidroxid de sodiu 5%, cînd apare o culoare albastră-violacee, colorimetrabilă.

i) *Identificarea glicozizilor strofantici* : 1. Se reia reziduul cu etanol și se tratează cu vanadat de amoniu 1% în acid sulfuric, cînd apare o culoare verde intensă. 2. Se tratează reziduul cu o soluție de furfurol 1% și 1—2 picături de acid sulfuric concentrat, cînd apare o culoare albastră-indigo. 3. Se dizolvă reziduul la cald într-un amestec de acid sulfuric concentrat și apă (4 : 1), cînd apare, în prezența strofantinei K, o culoare verde-smarald, iar în prezența ouabainei (strofantina G), o culoare roșie închis.

j) *Identificare din frunze și tablete* : se agită timp de 10 minute, 10—20 ml suspensie apoasă din produsul de analizat cu 10—20 ml cloroform, se adaugă 5 ml eter și 5 ml etanol și se agită din nou. Se separă faza eterocloroformică, se filtrează peste Na_2SO_4 anhidru și se evaporă pe baia de apă la sec. 1. Peste reziduu se adaugă 3 ml acid acetic glacial și 1—2 picături de clorură ferică 10% (proaspăt preparată). Lichidul se pipetează cu atenție peste acid sulfuric concentrat, cînd la zona de contact apare un inel verde-albastru-brun, 2. Peste reziduu se adaugă 2 ml reactiv Lafon (acid sulfuric concentrat și etanol în părți egale), se încălzește pe baia de apă pînă la ușoară brunificare și se tratează cu o picătură de soluție de clorură ferică 1%, cînd apare o culoare verde sau verde-albastră.

Scanned with OKEN Scanner

1) *Identificarea indirectă a digitoxinei din zahăr* : se epuizează zahărul (pe care bolnavii obișnuiesc să picure digitoxină) cu etanol de 95° și se încălzește reziduul alcoolic cu cîteva cristale de sulfat acid de potasiu, cînd se percepe mirosul caracteristic de acroleină, datorat glicerolului aflat în mod normal în soluția oficinală de digitoxină.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2 ml metanol : clorură de metilen (1 : 3) și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este : cloroform-etanol (10 : 1).

Revelarea se realizează prin expunere la lumina U.V. ; pulberizare cu anhidridă acetică : cloroform : acid sulfuric concentrat (20 : 5 : 1), uscare și expunere la lumina U.V. (fluorescență caracteristică).

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— digitoxina în H_2SO_4 (235, 340, 430, 485)

— ouabaina în H_2SO_4 (240, 325, 515)

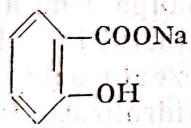
b) *I.R. (în KBr)*

— strofantina K : A (1071), B (1035), C (1733).

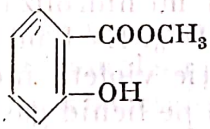
4. *Test fiziologic*

Glicozizii cardiotonici injectați la animal determină oprirea inimii în sistolă. Se experimentează pe inimă izolată de broască, cînd metoda necesită minimum 1 mg digitoxină. Metodele mai noi utilizează mușchi pupilar de pisică sau inimă embrionară de pasăre, cînd este necesar numai 1 microgram de digitoxină.

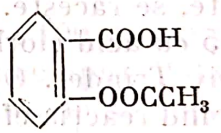
II.6.5. DERIVAȚII ACIDULUI SALICILIC



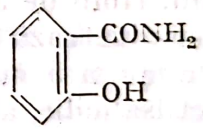
Salicilatul de sodiu



Salicilatul de metil (Saliform)



Acidul acetil-salicilic (Aspirina)



Salicilamida (Salizol)

A. Izolare

Derivații acidului salicilic se izolează din mediu acid cu solvenți organici. Salicilatul de metil poate fi antrenat cu vapori de apă.

a) *Izolare din urină* : se acidulează 25 ml urină cu 1 ml acid sulfuric 10% și se extrag de două ori cu cîte 30 ml eter. Extractele eterice reunite sînt evaporate la sec.

b) *Izolare din sînge (plasmă)* : se acidulează 10 ml sînge (2 ml plasmă) cu 0,5 ml acid clorhidric 20% și se extrag cu 50 ml dicloretan. Extractul organic este evaporat la sec.

c) *Izolare din lichide gastrice (spălătură stomacală, conținut stomacal)* : se acidulează 25 ml lichid gastric cu acid tartric la pH 4—5 și se aplică metoda Stas-Otto-Ogier. Lichidul apos acid se epuizează cu eter, cloroform, dicloretan. Extractele organice sînt filtrate și evaporate la sec.

Scanned with OKEN Scanner

d) *Izolare din corpuri delicte (resturi de medicamente etc.)* : produsul de analizat se pulverizează sau se suspendă în apă. Se acidulează cu acid clorhidric 10% la pH 4—5 și se extrage de două ori cu eter sau dicloretan. Extractele organice reunite sînt filtrate și evaporate la sec.

În cazurile c și d, pentru evidențierea ionului salicilic este necesară efectuarea hidrolizei în mediu alcalin (v. Identificare).

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) *Teste preliminare:* 1) *În urină*: la 1 ml urină se adaugă 3 picături de clorură ferică soluție 5% (proaspăt preparată ; o coloratie violetă indică prezența ionului salicilic. 2) *În urină și sînge* : la 0,5 ml urină sau plasmă se adaugă 4,5 ml soluție de azotat feric 0,55% în acid azotic 0,04 N. Se obține o coloratie violetă, proporțională cu concentrația în ion salicilic.

b) *Reacția Jorissen* : reziduul se dizolvă la cald în 2—3 ml apă și se adaugă 5 picături soluție nitrit de sodiu 10%, 2 picături acid acetic glacial și o picătură sulfat de cupru 10%. Se fierbe 2 minute. În prezența aspirinei sau a acidului salicilic se dezvoltă o coloratie roșie.

c) *Reacția cu clorură ferică* 1) *Urină* : se adaugă la 1 ml urină (eventual diluată 1/5), 5 ml reactiv Trinder, cînd apare, imediat, o coloratie violetă. Reacția este foarte sensibilă. În condițiile metodei, numai cantități mari de fenotiazine interferă prin apariția unor colorații slabe. Reacția se poate executa și prin spotare pe o hîrtie de filtru umectată cu reactiv Trinder. 2) *Sînge, lichid cefalorahidian* : se iau, într-un tub de centrifugă, 1 ml ser (plasmă, sînge total, l.c.r.) și 5 ml reactiv Trinder. Se agită un minut și se centrifughează cînd în stratul supernatant apare o coloratie violetă. 3) *Lichide gastrice* : în acest caz este necesar, pentru acidul acetilsalicilic, să se hidrolizeze lichidul în mediu alcalin la cald, deoarece altfel reacția este negativă sau numai slab pozitivă. Se iau într-un pahar Erlenmeyer, 10 ml lichid gastric, 10 ml apă și 1 ml hidroxid de sodiu 40%, se adaugă o bilă de sticlă și se fierbe pe sită, agitînd, timp de 3 minute, se răcește. Se ia 1 ml hidrolizat, se adaugă 4 ml apă și se ajustează la pH 5 cu acid clorhidric 10%. La 1 ml lichid ajustat la pH 5 se adaugă 5 ml reactiv Trinder. O coloratie violetă indică prezența acidului acetilsalicilic, atunci cînd reacția efectuată pe lichid gastric nehidrolizat a fost negativă sau slab pozitivă.

Reactiv Trinder : se aduc 20 g clorură mercurică într-un pahar Berzelius cu 425 ml apă și se încălzește pînă la dizolvare. După răcire se adaugă 20 g nitrat feric, $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\,H_2O$ și 60 ml acid clorhidric N. Clorura mercurică are rolul de a precipita proteinele, care se separă prin centrifugare și, eventual, filtrare, încît reactivul poate fi folosit și pentru sînge. Reactivul Trinder se păstrează indefinit.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în cîteva picături de acetonă sau se spotează urina direct. Sistemele de migrare sînt : acid acetic glacial : benzen : eter: metanol (1,8 : 12 : 6 : 0,1) sau amoniac concentrat : n. butanol : apă (3,3 : 10 : 6,6). Revelarea se realizează prin expunerea în lumina U.V. (254 nm) sau pulverizare cu soluție de clorură ferică 5%. Se pun în evidență, diferențiindu-se prin valorile Rf, atît acidul acetilsalicilic, cît și metaboliții săi, acidul salicilic și acidul gentizic.

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— acidul acetilsalicilic în H_2SO_4 0,1 N (229, 276)

— salicilamida în etanol (235, 302), NaOH 0,1 N (242, 323)

b) *I.R. (în KBr)*

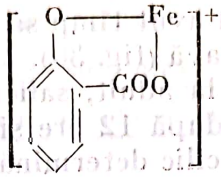
— acidul acetilsalicilic : A (1 183), B (1 688), C (1 305).

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Ionul salicilic formează cu ionul feric un complex de culoare violetă, colorimetrabil :



Reactivi

1. Reactiv Trinder ; 2. Soluție standard stoc : se aduc 0,2320 g salicilat de sodiu la 100 ml cu apă distilată (1 ml = 2 mg acid salicilic) ; 3. Soluție standard de lucru : se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1/5 (1 ml = 400 μg acid salicilic).

Modul de lucru

La 1 ml urină (eventual diluată) sau 1 ml ser (plasmă, l.c.r.) se adaugă 5 ml reactiv Trinder și se agită puternic, se centrifughează și se prelevează cu grijă supernatanul.

Se citește imediat extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 535$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 100 și 400 μg/probă (0,25—1 ml soluție standard de lucru completat la 1 ml cu apă). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a acidului salicilic, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sînge sau mg/litru urină :

$$\text{mg acid salicilic/100 ml sînge} = \frac{C}{10}$$

$$\text{mg acid salicilic/1000 ml urină} = C$$

în care :

C = concentrația acidului salicilic, în μg.

Observație

Metoda se pretează și la dozarea acidului salicilic din lichide gastrice hidrolizate (v. Identificare).

Interpretarea rezultatelor

1. Dozarea salicilemiei este esențială pentru stabilirea diagnosticului și evaluarea, în oarceare măsură, a gravității intoxicației. Dimpotrivă, saliciluria

are valoare limitată, deoarece ingerarea de numai 1—2 comprimate de aspirină determină o reacție pozitivă cu $FeCl_3$. În schimb, după stabilirea diagnosticului, dozările în dinamică în urină permit urmărirea eliminării toxicului. 2. Deoarece metabolizarea și eliminarea derivaților salicilici se desfășoară rapid, dozarea salicilemiei trebuie executată de trei ori, la intervale de cîte o oră din momentul internării intoxicatului, pentru a se preciza valoarea maximă atinsă și, în funcție de aceasta, să se instituie tratamentul. În cazul în care s-a ingerat o doză unică de toxic și se cunoaște momentul ingerării, este utilă nomograma Done, cu ajutorul căreia se pot afla, cu o singură dozare — salicilemia la un moment dat, de exemplu, la internare — atît salicilemia maximă, cît și rapiditatea descreșterii valorilor, și, implicit, gravitatea intoxicației. De exemplu, s-a găsit, la 24 ore de la intoxicare, o salicilemie de 60 mg/100 ml, ceea ce, prin extrapolare pe nomogramă, indică o salicilemie maximă (la 6 ore de la ingerare, cînd absorbția a avut timp să se realizeze) de 110 mg/100 ml, denotînd o intoxicație foarte gravă (fig. 30). 3. Ingerarea de 3—5 g acid acetil salicilic determină, în general, la adult, salicilemii de 25 mg/100 ml plasmă după 4 ore, de 15 mg/100 ml după 12 ore și de 5 mg/100 ml după 24 ore. Ingerarea de 20 g acid acetilsalicilic determină o salicilemie de 100 ml/100 ml.

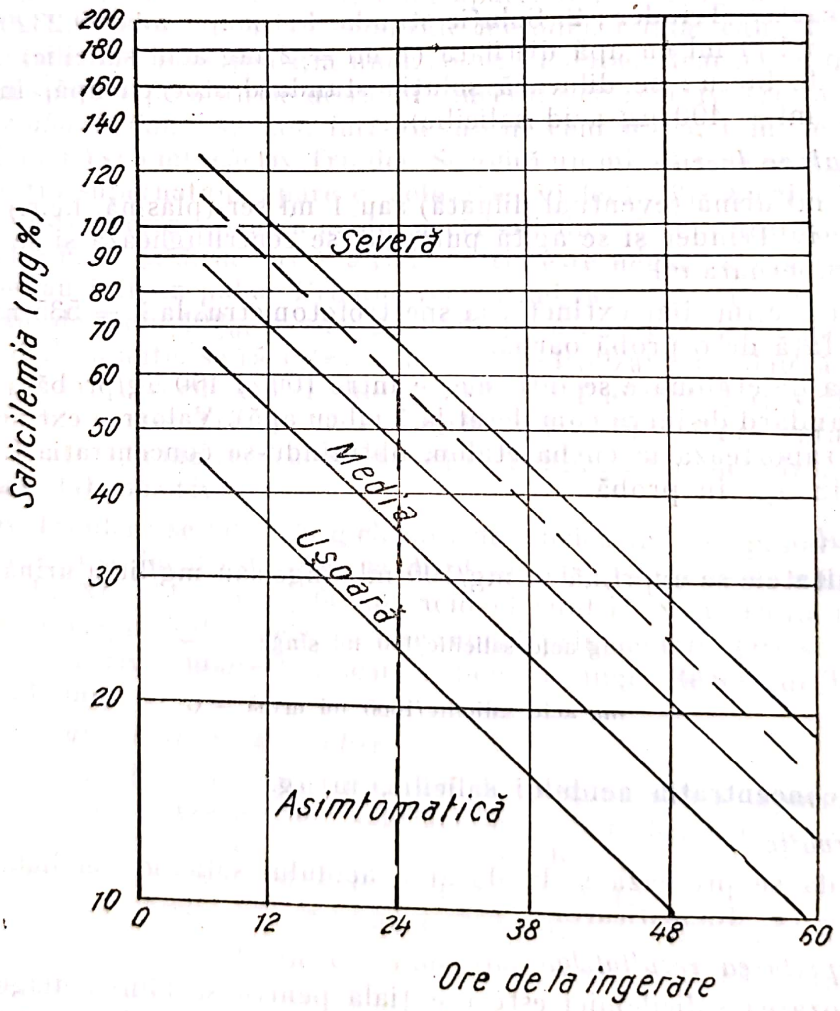


Fig. 30 — Nomograma Done.

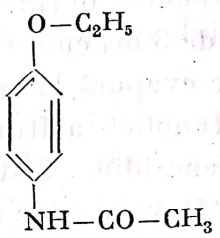
Saliciluria variază în raport cu diureza şi tratamentul, dar se înscrie, de obicei, în intoxicaţiile acute, între 1 000 şi 4 000 mg/litru urină. Corelaţia între salicilemie şi gravitatea intoxicaţiei este redată în tabelul 16.

Tabelul 16

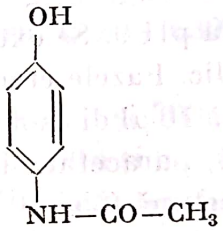
Corelaţia între salicilemie şi gravitatea intoxicaţiei (după Meunier)

Salicilemie mg/100 ml plasmă	*Manifestare clinică*
50	Lipsa, în general, a manifestărilor clinice
50— 80	Intoxicaţie uşoară sau medie
80—100	Intoxicaţie gravă, cu apariţia tulburărilor neurologice
100—150	Intoxicaţie foarte gravă
150	Intoxicaţie, de obicei, fatală

II.6.6. DERIVAŢII p. AMINOFENOLULUI



Fenacetina



Paracetamolul

A. **Izolare**

Fenacetina se izolează din mediu uşor acid sau alcalin, iar paracetamolul din mediu acid, cu solvenţi organici (de preferat, cloroform).

a) *Izolare din urină şi sînge* : se acidulează 20 ml urină (2 ml ser) cu acid acetic 5% la pH 5—6 şi se extrag de două ori cu cîte 50 ml cloroform (eter). Extractele organice reunite sînt repartizate în capsule şi evaporate la sec. Reziduul dintr-o capsulă este tratat cu 2 ml acid clorhidric 20% şi hidrolizat pe baia de apă la fierbere, apoi se adaugă 10 ml apă şi se filtrează. Identificarea se execută atît pe reziduu, cît şi pe filtrat sau direct pe urină.

B. **Identificare**

1. *Reacţii de culoare*

a) *Test preliminar* : se adaugă la 2 ml urină acidulată cu HCl 10%, 3 picături nitrit de sodiu 1% şi 3 picături soluţie alfanaftol 1% în NaOH 10% (proaspăt preparată). În prezenţa paracetamolului (metabolit al fenacetinei) se dezvoltă o culoare roşie.

b) *Reacţia indofenolului* : se adaugă la 2 ml filtrat o picătură de fenol 1% şi 2—3 pictăuri de hipobromit (v. Dozare), cînd apare o culoare roşu închis, care în mediu alcalin trece în albastru.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Reacția cu acid sulfuric și acetaldehidă*: se tratează reziduul cu 1 ml H_2SO_4 conc. și 4—5 picături acetaldehidă, cînd se dezvoltă o culoare roșie.

d) *Reacția de diazotare și cuplare*: se adaugă la 2 ml filtrat, 0,5 ml acid clorhidric 10% și 0,1 ml nitrit de sodiu 1%. Se agită și se lasă în repaus 10 minute. Se adaugă 2 ml uree 10%, se agită și după 10 minute se adaugă 0,2 ml N-naftiletilendiamină (NED) 1%, cînd apare o culoare violetă.

e) *Reacția cu clorură ferică*: se tratează 10 ml urină cu 1 ml $FeCl_3$ 1% (proaspăt preparată), cînd se obține o culoare roșie, virînd în brun.

f) *Reacția cu dicromat de potasiu*: se tratează 1 ml filtrat cu 2—3 picături dicromat de potasiu 5%, cînd se dezvoltă o culoare roșie. În aceleași condiții, acetanilida dă o culoare galbenă, care virează în verde.

2. *Identificare din corp delict (resturi de medicamente)*

Se fierbe 0,1 g substanță cu 1 ml acid clorhidric concentrat timp de 3 minute. Se diluează la 10 ml cu apă, se răcește, se filtrează și se adaugă o picătură dicromat de potasiu 0,1 N. În prezența fenacetinei apare o culoare violetă care trece în roșu-rubiniu, iar în prezența paracetamolului, se dezvoltă lent o culoare violetă care nu virează în roșu.

3. *Cromatografie în strat subțire (tehnica Balogh)*

La 25 ml urină se adaugă 10 g NaCl (pentru optimizarea extragerii) și se aduce cu NaOH 10% la pH 9. Se extrage de 3 ori cu cîte 30 ml eter cu adaus de 1,5% alcool izoamilic. Fazele eterice se evaporă la sec. Se reia reziduul cu 1 ml etanol. Se spotează 10 µl din soluția etanolică, alături de martori — soluții etanolice de fenacetină, paracetamol, p. fenetidină. Sistemul de migrare este cloroform : benzen : acetonă (65 : 10 : 25). Revelarea se realizează prin expunere 10 minute la vapori de iod, apoi pulverizare cu KI, soluție 10% în amidon 1%, cînd apar sporuri albastre-violet; pulverizare cu soluție clorură ferică-ferricianură de potasiu (3 g $FeCl_3$ și 0,15 g $[Fe(CN)_6]$ dizolvate în 30 ml apă), cînd apar spoturi albastre-violet pe fond albastru deschis. Rf-urile sînt 0,81 fenacetină, 0,41 paracetamol, 0,91 p. fenetidină.

Pentru diferențierea fenacetinei de fenazonă, aminofenazonă, acetanilidă, se folosește ca sistem de migrare, acetonă cloroform (1 : 9). Revelarea se realizează prin pulverizare cu clorură ferică 5% în acetonă; după încălzire ușoară, apar spoturi roșii-violet pe fond galben.

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

— fenacetina în etanol (250)

— paracetamolul în metanol (249)

b) *I.R. (în KBr)*

— fenacetina : A (1 243, 1 655), B (1 513,), C (1 555)

— paracetamolul : A (1 650), B (1 563), C (1 443)

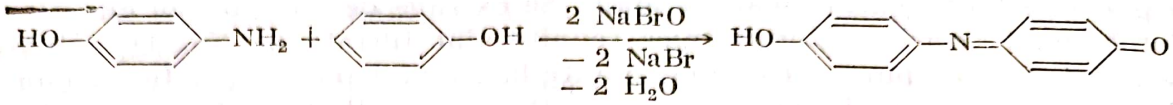
C. **Dozare**

1. *Meloda spectrofotometrică (reacția indofenolului)*

Scanned with OKEN Scanner

Principiu

După hidroliză acidă, din fenacetină și paracetamol (metabolitul său urinar) rezultă paraminofenol, care în prezența fenolului și a hipobromitului, formează indofenol :



Reactivi

1. Acid clorhidric 4 N. 2. Hidroxid de sodiu 0,2 N. 3. Fenol, soluție apoasă 1%(proaspăt preparată). 4. Soluție apoasă de hipobromit de sodiu. Se amestecă 3 ml apă de brom saturată cu 20 ml soluție de carbonat de sodiu (2,2 g Na_2CO_3 anhidru la 20 ml apă). 5. Soluție standard : se aduc 0,1000 g fenacetină la 200 ml cu apă (1 ml = 500 μg fenacetină).

Modul de lucru

Într-o eprubetă gradată se iau 1 ml urină, 1 ml apă și 4 ml acid clorhidric 4 N. Se fierbe pe baia de apă la 100°C timp de 45 minute și se aduce cu apă la 10 ml. Din această soluție (hidrolizat de urină) se ia 1 ml, se adaugă 8 ml NaOH 0,2 N, 1 ml fenol 1% și 1 ml soluție hipobromit. Se lasă la întuneric 30 minute,

Se citește extincția la spectrofotometru, la λ = 630 nm, în cuvă de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 100 și 500 μg/probă (0,2—1,0 ml soluție standard completat la 1 ml cu apă distilată și lucrată în condiții identice cu proba-hidroliză și obținerea culorii). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 10 (deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă) obținîndu-se concentrația C a fenacetinei în μg, în probă.

Calcul

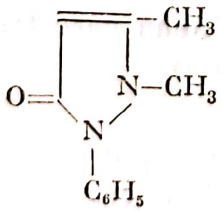
Rezultatele se exprimă în mg fenacetică/litru urină :

$$\text{mg fenacetină/litru urină} = C$$

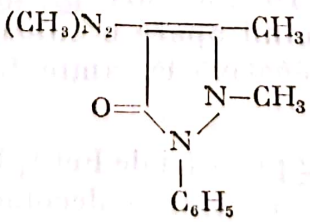
în care :

C = concentrația fenacetinei, în μg.

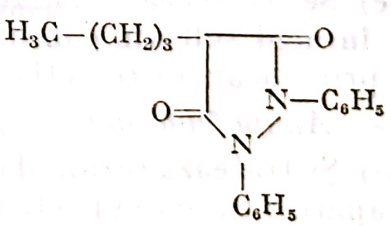
II.6.7. DERIVAȚII PIRAZOLONEI



Fenazona
(Antipirina,
Analgezina)



Aminofenazona
(Amidopirina,
Piramidonul)



Fenilbutazona
(Butazolidin, Butapirazol)

Scanned with OKEN Scanner

A. **Izolare**

Fenazona și aminofenazona se izolează din mediu neutru, ușor alcalin sau ușor acid, iar fenilbutazona, din mediu acid, cu solvenți organici.

a) *Izolare din urină și sînge* : se alcalinizează 50 ml urină (5 ml plasmă) la pH 8 cu hidrogencarbonat de sodiu. Se extrage de două ori cu cîte 50 ml cloroform. Extractele cloroformice reunite sînt filtrate pe Na_2SO_4 anhidru, eventual și pe cărbune activ și evaporate la sec pe baia de apă. În reziduu se identifică fenazona și aminofenazona. Pentru fenilbutazonă se procedează identic, însă se extrage din mediu cu pH ușor acid, cu cloroform pentru urină și cu hexan pentru sînge.

b) *Izolare din organe* : se triturează 10 g organe cu 1 g nisip purificat, se adaugă 10 ml apă distilată și 10 ml acid tungstic 10%. Se încălzește 15 minute pe baia de apă, pentru a se favoriza precipitarea proteinelor. Se filtrează pe pîlnie Büchner, se alcalinizează filtratul la pH 8 cu amoniac concentrat și se extrage de două ori cu cîte 50 ml cloroform. Extractele reunite sînt evaporate pe baia de apă la sec. În reziduu se identifică fenazona și aminofenazona. Pentru fenilbutazonă se procedează identic, însă se extrage din mediu la pH ușor acid.

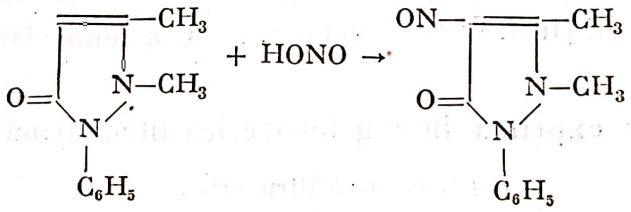
B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

— *Fenazona*

a) *Reacția feripirinei* : se tratează reziduul cu 0,5 ml clorură ferică 1% (proaspăt preparată), cînd apare o culoare roșie, care se intensifică la încălzire și dispare la adaus de acid sulfuric.

b) *Reacția nitrozoantipirinei* : se dizolvă reziduul în 0,5 ml azotit de sodiu 5% și se adaugă 0,5 ml acid sulfuric 10%, cînd apare o culoare verde persistentă, prin formarea nitrozoantipirinei :



c) Se tratează reziduul cu 1—2 picături acid clorhidric 10% și 1—2 picături formol 40%, se încălzește la fierbere și, după răcire, se alcalinizează cu amoniac diluat, cînd apare un precipitat alb (spre deosebire de aminofenazonă).

d) Se tratează reziduul cu 3—4 picături reactiv Mandelin, cînd apare o colorație verde.

e) Se tratează reziduul cu 10 picături p. dimetilaminobenzaldehidă 10% în acid sulfuric concentrat, cînd apare o culoare galbenă care trece în roșu prin încălzire (reacția este negativă cu aminofenazona).

— *Aminofenazona*

a) Se tratează reziduul cu 1—2 picături de $FeCl_3$ 1% (proaspăt preparată), cînd apare o culoare violetă trecătoare, care se decolorează în exces de reactiv.

b) Se dizolvă reziduul în 0,5 ml azotit de sodiu 5% și se adaugă 0,2 ml acid sulfuric 10%, cînd se dezvoltă o culoare albastră-violacee, trecătoare.

Scanned with OKEN Scanner

c) Se tratează reziduul cu 1 ml persulfat de potasiu 1%, cînd apare o culoare albastră, care trece succesiv în roşu-violet şi galben.

d) Se reia reziduul cu cîteva picături acid fosforic d = 1,71 şi se adaugă cîteva cristale de clorat de potasiu, cînd se formează o culoare galbenă-aurie.

— *Fenilbutazona*

a) Se tratează reziduul cu cîteva picături reactiv Mandelin, cînd apare o culoare roşie.

b) Se dizolvă reziduul în 1 ml apă şi se adaugă 1 ml reactiv Folin-Ciocîlteu (v. Substanţe curarizante), cînd, după alcalinizare, apare o coloraţie albastră.

c) Se fierbe reziduul cu acid fosforic ; benzidina formată prin hidroliză este identificată prin diazotare şi cuplare cu betanaftol sau N-naftiletilendiamină (NED).

2. *Cromatografie în strat subţire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml cloroform şi se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sînt : etanol : cloroform (1 : 9) ; sau acetonă : cloroform (1 : 9) pentru aminofenazonă ; cloroform : metanol (9 : 1) sau acetat de etil : metanol : amoniac concentrat (8,5 : 1: 0,5) pentru fenilbutazonă.

Revelarea se realizează prin expunere în lumina U.V.; pulverizare cu reactiv Dragendorff sau reactiv Bouchardat (pentru aminofenazonă) şi permanganat de potasiu 1% (spoturi galbene pe fond roz) sau fericianură de potasiu 1% şi clorură ferică 0,1% (în volume egale) (spoturi albastre) pentru fenilbutazonă.

3. *Spectrofotometrie în U.V. şi I.R.*

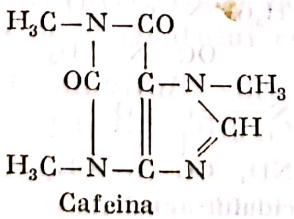
a) *U.V. (maxime)*

— fenazona în H_2SO_4 0,1 N (230)
— aminofenazona în H_2SO_4 0,1 N (256)
— fenilbutazona în etanol (240), NaOH 0,01 N (264)

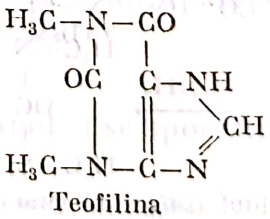
b) *I.R. (în KBr)*

— fenazona : A (1 660), B (770), C (1 486)
— aminofenazona : A (1 660), B (1 315), C (1 126).
— fenilbutazona : A (1 708), B (1 300, 1 743), C (755).

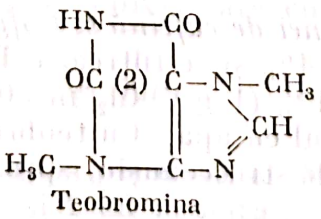
II.6.8. METILXANTINELE



Cafeina



Teofilina



Teobromina

Scanned with OKEN Scanner

A. **Izolare**

Metilxantinele se izolează (din organe, spălătură gastrică, vomă, sînge, urină) din mediu acid, prin extragere cu solvenți organici. Teofilina și cafeina pot fi extrase și din mediu alcalin, cu cloroform sau eter, spre deosebire de teobromină, care în mediu alcalin formează enolați în C_2, neextractibili cu solvenți organici.

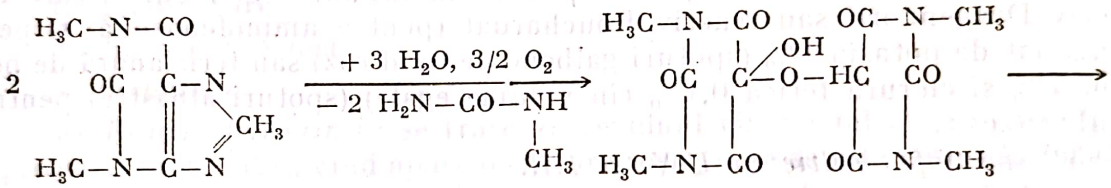
B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare*

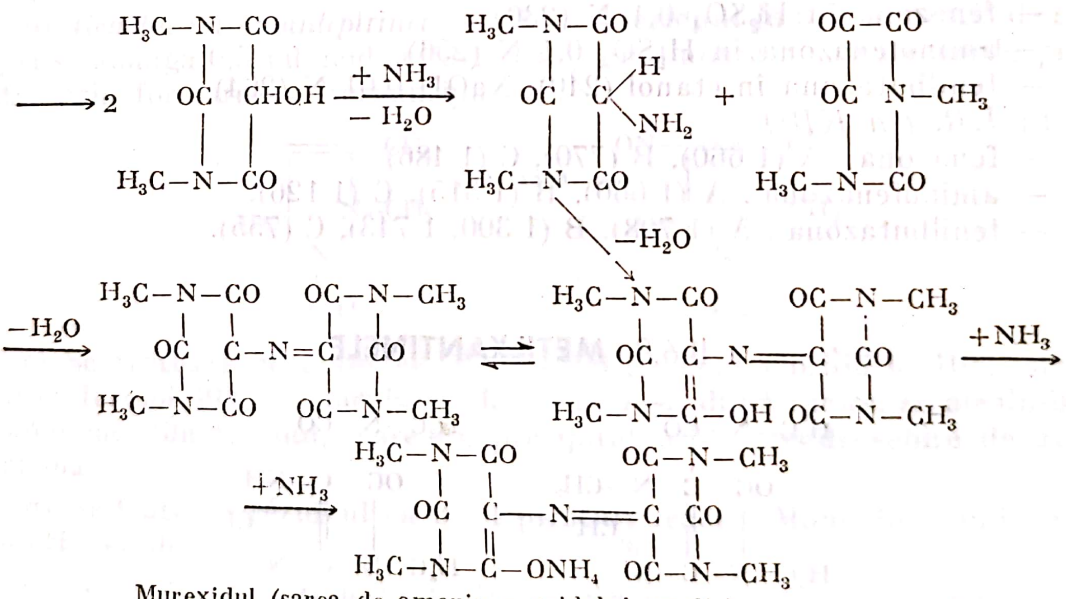
Dintre reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor, metilxantinele dau precipitate cu *reactivul Schleibler*, *reactivul Sonnenschein*, *acidul tanic* 2% (precipitatul este solubil în exces de reactiv).

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacția murexidului* : reziduul se tratează cu cîteva picături de apă oxigenată și acid clorhidric 10% (sau alt oxidant) și se evaporă la sec pe baia de apă. Reziduul format este inițial incolor, dar devine galben la aer. Dacă este expus la vapori de amoniac sau tratat cu 2 picături de amoniac, trece în roșu-purpuriu datorită formării murexidului (sarea de amoniu a acidului purpuric sau amalic). Reacția este caracteristică celor trei metilxantine, ca și acidului uric :



Cafeina



Murexidul (sarea de amoniu a acidului amalic)

b) *Diferențierea teobrominei de cafeină și teofilină :* reziduul se agită două minute cu hidroxid de sodiu 4% și se filtrează. Filtratul se tratează cu 2 picături de clorură de cobalt 1% (1 g $CoCl_2$ în 80 ml apă ; se adaugă 0,4 ml HCl 10% și se aduce la 100 ml cu apă). Cu teobromina se formează o culoare violetă, apoi un precipitat albastru-cenușiu, spre deosebire de cafeină și teofilină.

Scanned with OKEN Scanner

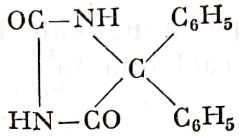
3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(tabelul 17)

Tabelul 17

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale metilxantinelor (după Clarke)

Metilxantina	*U.V. (maxime)*		*I.R. (în KBr)*		
	Etanol	*HCl 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Cafeina	273	272	1 658, 1 695	745	
Teofilina		270	1 660	1 700	1 445, 1 560
Teobromina			1 690	1 221	1 550

II.6.9. FENITOINA



A. **Izolare**

Fenitoina (difenilhidantoina) se izolează din mediu acid (pH optim 6,8) cu solvenți organici (cloroform, eter, hexan, dicloretan).

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) *Reacția cu nitrat mercuros :* se reia reziduul în 0,5 ml etanol și se spotează pe o hîrtie de filtru impregnată cu soluție 10% de fosfat trisodic, apoi se pulverizează cu nitrat mercuros soluție saturată, cînd apare o culoare neagră.

b) *Reacția cu nitrat de cobalt :* se dizolvă reziduul în metanol și se tratează cu 1 ml nitrat de cobalt 1% în metanol, apoi cu o picătură de hidroxid de sodiu 10%, cînd apare o culoare albastră-violacee. Alcalinizarea cu dietilamină 1% în metanol pune în evidență derivații barbiturici.

c) *Reacția de diazotare și cuplare :* se adaugă peste reziduu 1—2 ml amestec nitrant. După 15 minute se reduce gruparea NO_2 la NH_2 care se diazotează și se cuplează cu NED sau betanaftol, cînd apare o colorație violetă sau roșie, datorată azoderivatului corespunzător.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă rezidul în 0,2—0,5 ml metanol și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martor.

Sistemul de migrare este cloroform : acetonă (9 : 1).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu nitrat mercuros soluție saturată, cînd apar spoturi negre.

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V.*

Se alcalinizează 5 ml sînge la pH 8—9 cu NH_4OH, apoi se extrag cu un amestec de 20 ml ciclohexan și 1 ml n. butanol, se centrifughează, se înde-

Scanned with OKEN Scanner

părtează faza apoasă, și se spală faza organică, cu 10 ml acid clorhidric N. În aceste condiții, majoritatea fenobarbitalului (dacă este prezent, avînd în vedere că de obicei fenitoina este prescrisă împreună cu fenobarbitalul) rămîne în faza apoasă. Faza organică este extrasă cu 4 ml tampon carbonat acid de Na *p*H 11, se măsoară absorbția extractului în U.V. de la 220 la 270 nm și se compară cu o curbă obținută cu un extract de fenitoină pură, tratat în mod similar. Metoda poate servi și pentru dozare, bazată pe diferența extincției la 240 și 260 nm.

Tampon carbonat acid de Na *p*H 11 : se dizolvă 8,401 g carbonat acid de sodiu și 3,6 g hidroxid de sodiu în apă și se aduce cu apă la 1 000 ml.

b) *I.R. (în KBr)*

Valorile absorbțiilor maxime ale fenitoinei sînt : A (1 713, 1 747) B (1 766), C (748).

C. **Dozarea**

1. *Metoda spectrofotometrică în U.V.*

Principiu

Fenitoina se oxidează cu permanganat de potasiu, rezultînd, prin ruperea ciclului, benzofenona, extractibilă în n. heptan și avînd maximum de absorbție în U.V. la 254 nm.

Reactivi

1. Tampon fosfat *p*H 6,8. Se dizolvă 13,6 g KH_2PO_4 anhidru și 14,2 g Na_2HPO_4 anhidru în 200 ml apă. 2. Hidroxid de sodiu N. 3. Hidroxid de sodiu 9 N. 4. Permanganat de potasiu 5%. 5. n. heptan. 6. Soluție standard stoc : se cîntăresc 0,0800 g fenitoină și se aduc cu apă distilată la 100 ml (1 ml = 0,8 mg). 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 8 micrograme).

Modul de lucru

Se iau într-o pîlnie de separare 5 ml urină (sînge, lichid gastric), 5 ml tampon fosfat, 30 ml cloroform și se agită 5 minute. Se trece prin filtrare faza organică în altă pîlnie de separare, se adaugă 6 ml hidroxid de sodiu N și se agită 5 minute. Se separă faza apoasă alcalină și se centrifughează pentru îndepărtarea urmelor de cloroform. Din această soluție se trec 4 ml într-un balon Erlenmeyer și se încălzesc la 60°C, timp de 15 minute, evitînd evaporarea prin acoperirea balonului cu o pîlnie întoarsă. Se adaugă 16 ml hidroxid de sodiu 9 N, 6 ml permanganat de potasiu 5%, 5 ml n. heptan și se continuă încălzirea încă 30 minute, agitînd periodic. Se lasă să se răcească, se separă faza heptanică și se citește extincția Ep la spectrofotometru la 247 nm, față de o probă oarbă (n. heptan prelucrat în condiții identice cu proba) Se citește apoi extincția Es a unei probe standard cu concentrația de 4 micrograme/5 ml apă (0,5 ml soluție standard de lucru și 4,5 ml apă) prelucrată în condiții identice cu proba.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg fenitoină/100 ml lichid biologic.

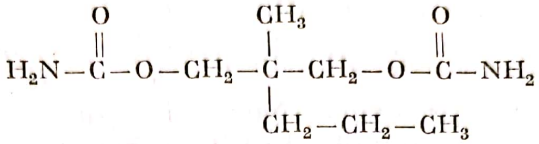
$$\text{mg fenitoină/100 ml lichid biologic} = \frac{Ep}{Es} \times 0{,}8$$

Scanned with OKEN Scanner

Interpretarea rezultatelor

După doze terapeutice de fenitoină, concentrațiile sanguine sînt în jur de 1 mg/100 ml, iar în intoxicații, peste 4 mg/100 ml.

II.6.10. MEPROBRAMATUL



A. **Izolare**

Meprobamatul se izolează din mediu acid, neutru sau alcalin, cu eter, diclormetan, cloroform, randamentul maxim obținîndu-se din mediul acid. Extragerea derivaților conjugați se realizează după o prealabilă hidroliză acidă.

a) *Izolare din mediu acid cu eter.* 1. Se acidulează 30—50 ml urină (lichide gastrice) într-o pîlnie de separare cu acid clorhidric aconcentrat pînă la *p*H 4 și se extrag de două ori cu cîte 30 ml eter. Extractele eterice reunite sînt spălate cu 20 ml apă distilată, filtrate pe sulfat de sodiu anhidru și evaporate la sec. 2. Se aplică, pentru sînge, metoda Griffon-Le Bretton (v. Derivații barbiturici).

b) *Izolare din mediu acid cu diclormetan :* se iau, într-o eprubetă gradată, 2 ml ser (urină), 0,2 ml acid clorhidric 1/5 și 60 ml diclormetan. Se agită puternic 3 minute, se lasă să se separe fazele și se repetă agitarea 3 minute. Se elimină faza apoasă supernatantă prin aspirare cu o pipetă efilată racordată la trompa de vid. Se spală faza organică de două ori cu cîte 15 ml apă distilată și se îndepărtează, prin aspirare, faza apoasă. Faza organică este filtrată pe sulfat de sodiu anhidru și evaporată la sec.

c) *Izolare din mediu neutru cu diclormetan* : se agită puternic timp de 10 minute, 2 ml plasmă cu 10 ml diclormetan. Se centrifughează și se filtrează faza organică pe sulfat de sodiu anhidru. Se evaporă la sec pe baia de apă la 60°C.

d) *Izolare din mediu alcalin cu diclormetan sau cloroform.* 1. Se iau, într-o eprubetă de centrifugă, 2,5 ml ser (plasmă), 0,5 ml amoniac concentrat, 0,5 ml clorură de potasiu soluție saturată și 25 ml diclormetan. Se agită puternic 3 minute. Se centrifughează și se îndepărtează prin aspirare faza apoasă supernatantă. Se evaporă la sec faza organică la 60°C. 2. Se alcalinizează cu amoniac la *p*H 10, 20—50 ml urină și se extrag de două ori cu un volum dublu de cloroform. Extractele reunite sînt spălate cu 20 ml apă, uscate pe sulfat de sodiu anhidru și evaporate la sec.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare și fluorescență*

a) *Reacția Nadeau-Sobolewski :* se tratează reziduul cu cîteva cristale de hidrochinonă, 0,3 ml apă distilată și 3 ml acid sulfuric concentrat, cînd apare, în maximum 5 minute, prin expunere în lumina U.V. (366 nm), o fluorescență roz-portocalie. Dacă reziduul provine din lichide gastrice, este

Scanned with OKEN Scanner

necesar ca soluția să fie menținută 15 minute pe baia de apă la fierbere. Reacția este interferată de fenotiazine.

b) *Reacția unui acid sulfuric :* se încălzește reziduul pe baia de apă cu acid sulfuric concentrat, timp de 10 minute, cînd, prin expunere în lumina U.V. (366 nm) se observă o fluorescență alb-verzuie caracteristică.

c) *Reacția cu furfurol.* 1. Se reia reziduul cu 1,5 ml acetonă, la care se adaugă imediat 0,1 ml acid sulfuric concentrat. Se agită cu o baghetă pentru a ușura dizolvarea și omogenizarea. Se adaugă 0,1 ml furfurol 1% în acetonă (preparată extemporaneu) și se imprimă capsulei o ușoară mișcare de rotație, pentru a distribui amestecul pe pereții capsulei. Se lasă în repaus cîteva minute, cînd apare, pe pereții capsulei și deasupra fazei lichide, un inel discontinuu, intens colorat în violet. Nu se iau în considerare inelele verzi, brune sau cenușii (tehnica Heyndrickx) 2. Se reia reziduul, de la izolarea în mediu alcalin, cu 1 ml eter și se spotează pe o hîrtie de filtru, în paralel cu o probă martor. Se pulverizează cu furfurol 10% în etanol și se usucă la temperatura laboratorului. Se expune la vapori de acid clorhidric cînd apar aporturi albastru închis. Reacția cu furfurol nu este specifică.

d) *Reacția cu* CO^{2+} *:* se reia reziduul cu 2 ml etanol și se trece într-o eprubetă. Se adaugă 2 ml hidroxid de potasiu 6% în etanol și un fragment de piatră ponce. Se închide eprubeta cu un dop prin care trece un tub de sticlă și se încălzește pe baia de apă timp de 10 minute. Se neutralizează cu 0,2 ml acid acetic glacial și se tratează cu 2,5 ml clorură de cobalt 0,1% în alcool absolut, cînd apare o culoare violacee.

e) *Reacția Bourdon-Nicaise :* la extractul eteric evaporat într-o eprubetă, se adaugă, în ordine, următorii reactivi, în prealabil răciți la 4°C : 0,6 ml amestec de 3 volume anisol și 1 volum acid acetic glacial ; 0,5 ml acetonă anhidră ; 0,3 ml soluție paradimetilaminobenzaldehidă (14 g p. dimetilaminobenzaldehidă, anisol q.S. ad 100 ml) ; 2 ml soluție de clorură de aluminiu (0,15 ml metilcelosolv, 50 ml anisol, 2,25 g clorură de aluminiu). În prezența carbamaților se observă o culoare roșie sau roșie-violacee. În paralel se execută o probă martor cu cîteva miligrame de meprobamat. Reacția este sensibilă (3 micrograme/ml) și specifică.

f) *Identificare din forme farmaceutice :* se pulverizează comprimatul și se triturează cu 5 ml alcool. Se filtrează, se evaporă 2 ml filtrat la sec într-o capsulă de sticlă. Se răcește. Se adaugă 2 ml paradimetilaminobenzaldehidă 10% în acid sulfuric concentrat (preparat extemporaneu). Se omogenizează, cînd apare o culoare galbenă. Se menține capsula 3 minute pe baia de apă la fierbere, cînd culoarea virează la roșu. Se răcește în apă cu gheață și se adaugă, cu picătura, 2 ml apă distilată răcită la gheață, cînd culoarea trece în albastru-violet.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml metanol și se spotează pe cromatoplacă, în paralel cu un martor.

Sistemele de migrare sînt : ciclohexan-etanol (8 : 2) ; cloroform : metanol (9 : 1) ; metanol : amoniac 12 N (100 : 1,5) ; n. butanol : amoniac (9 : 1).

Revelarea se realizează prin : a) uscarea cromatoplăcii 15 minute la 70°C și pulverizare abundentă cu furfurol 1% în acetonă (preparată extemporaneu), apoi cu o soluție de acid sulfuric 4% în acetonă (preparată extemporaneu), cînd apar aporturi violete ; reacția este interferată de fenotiazine ; b) pulverizare cu hidrochinonă 2% în acid sulfuric concentrat și uscare 20—30 mi-

nute la 70°C, apoi expunere la lumina U.V. cînd apar spoturi fluorescente roz.

3. *Spectrofotometrie în I.R.*

Meprobamatul (în KBr) : A(1688), B(1069), C(1408).

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (formarea tetracianatocobaltoatului dipotasic)*

Principiu

Metrobamatul, prin tratare cu hidroxid de potasiu soluție alcoolică, se degradează la cianat, iar acesta cu Co^{2+} în alcool, în mediu acid, trece în tetracianatocobaltoatul dipotasic, violet, colorimetrabil :

$$R-COO-NH_2 + KOH \rightarrow R-OH + KNCO + H_2O$$

$$4\ KNCO + CaCl_2 \rightarrow K_2[Co(NCO)_4] + 2\ KCl$$

Reactivi

1. Etanol. 2. Hidroxid de potasiu 10% în etanol. 3. Acid acetic glacial. 4. Clorură de cobalt 0,1% în alcool absolut. 5. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,2500 g meprobamat în 50 ml etanol. (1 ml = 5 mg). 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc în proporție de 1 : 100 (1 ml = = 50 μg).

Modul de lucru

Se dizolvă reziduul în 10 ml etanol, se adaugă 5 ml KOH și se fierbe la refrigerent ascendent pe baia de apă timp de o oră. Se prelucrează în condiții identice o probă etalon (10 ml din soluția standard de lucru). Se răcește și se aduce cu etanol într-un balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluție și se adaugă 1 ml acid acetic glacial, se agită și se adaugă 0,5 ml $CoCl_2$. După 15 minute se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 610$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg meprobamat degradat/5 ml (se iau 1—5 ml soluție de meprobamat degradat din balonul de 25 ml și se completează la 5 ml cu etanol). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 5 (deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă) obținîndu-se concentrația C a meprobamatului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sînge sau mg/litru urină :

$$\text{mg meprobamat/100 ml sînge} = \frac{C}{A \cdot 10}$$

$$\text{mg meprobamat/litru urină} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația meprobamatului, în μg ;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică (tehnica Bourdon-Nicaise)*

Principiu

Meprobamatul formează, cu paradimetilaminobenzaldehidă în amestec anisol-acid acetic și în prezența acetonei și a tricloruri de aluminiu anhidră (cu rol de „catalizator"), un produs de condensare, colorimetrabil.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi

1. Amoniac d = 0,90. 2. Clorură de potasiu, soluție saturată. 3. Diclormetan. 4. Soluție anisol-acid acetic (anisol, 3 volume, acid acetic glacial, 1 volum). 5. Acetonă pură anhidră. 6. Paradimetilaminobenzaldehidă în anisol (14 g paradimetilaminobentaldehidă, anisol ad 100 ml). Se păstrează la frigider o săptămînă. 7. Soluție de clorură de aluminiu. Se dizolvă 2,25 g clorură de aluminiu anhidră într-un amestec de anisol 50 ml și metilcelosolv 0,15 ml. 8. Soluție standard stoc. Se dizolvă 0,1000 g carbamat în soluție anisol-acid acetic și se completează la 100 ml cu aceeași soluție (1 ml = 1 mg). 9. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu amestec anisol-acid acetic în proporție de 1 : 10 (1 ml = 100 μg).

Modul de lucru

Într-un tub de centrifugă cu dop rodat de 40 ml se iau : 2,5 ml urină (ser, plasmă), 0,5 ml amoniac, 0,5 ml clorură de potasiu, 25 ml diclormetan. Se agită puternic timp de 3 minute, continuu. Se centrifughează. Se elimină faza apoasă superioară prin aspirare. Se iau 15 ml din faza organică și se evaporă la temperatură joasă, sub presiune scăzută, într-o eprubetă cu dop rodat. Se dizolvă reziduul în 2 ml soluție anisol-acid acetic. Într-o eprubetă scufundată în gheață se iau : 0,3 ml soluție de extract în anisol-acid acetic, 0,3 ml soluție anisol-acid acetic, 0,5 ml acetonă, 0,3 ml paradimetilaminobenzaldehidă, 2 ml soluție de clorură de aluminiu, se agită. După 2—5 minute de la adausul soluției de clorură de aluminiu, se măsoară extincția, la spectrofotometru, la λ = 540 nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg, prin puncte din 10 în 10 (0,1—0,5 ml soluție standard de lucru, completat la 0,6 ml cu soluție anisol-acid acetic, la care se adaugă acetonă, paradimetilaminobenzaldehidă și clorură de aluminiu, în cantitățile de mai sus). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a meprobamatului în μg, în 0,3 ml soluție de extract.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg meprobamat/litru lichid biologic. În cazul cînd s-au utilizat cantitățile de mai sus — formula este următoarea :

$$\text{mg meprobamat/litru} = \frac{C \times 2 \times 25 \times 1\,000}{0{,}3 \times 15 \times 2{,}5 \times 1\,000} = 4{,}4 \times C$$

în care :

C = concentrația meprobamatului în 0,3 ml soluție de extract, în μg ;
2 = soluție de extract, în ml ;
0,3 = soluție de extract luat în lucru, în ml ;
25 = diclormetan, în ml ;
15 = diclormetan luat în lucru, în ml ;
1 000 = urină (sînge) în ml ;
2,5 = urină (sînge) luat în lucru, în ml ;
1 000 = transformarea μg în mg.

Observații

1. Reactivii trebuie să fie puri și solvenții (diclormetan, anisol, metilcelosolv) redistilați. Soluțiile se prepară extemporaneu. 2. În raport cu cantitatea de meprobamat observă în produsul biologic la identificare se iau

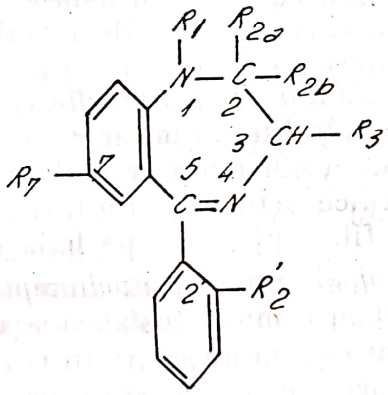
Scanned with OKEN Scanner

0,3 ml soluție de extract în anisol-acid acetic, ori un volum mai mic sau mai mare (fără a depăși 0,6 ml), completîndu-se la 0,6 ml cu anisol-acid acetic, astfel încît extincția să se încadreze între 0,200 și 0,800. 3. Reacția are loc între 0° și 5°C ; de aceea, atît eprubetele în care se execută reacția, cît și cuvele spectrofotometrului vor fi răcite la această temperatură. 4. Se notează exact timpul scurs între adăugarea clorurii de aluminiu și citirea extincției pentru probă. Acest timp (între 2 și 5 minute, de exemplu, 3 minute) va fi respectat și la prepararea etaloanelor. 5. Reacția este interferată de uree. 6. Metoda se prezeată și pentru dozarea altor carbamați primari (de exemplu, Carisoprodol), utilizați ca tranchilizanți minori.

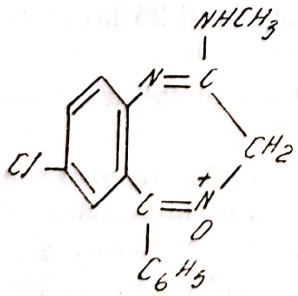
Interpretarea rezultatelor

1. În tratamente cu meprobamat s-au găsit următoarele concentrații sanguine și urinare : la 0,8 g/24 ore, 5 mg/litru sînge și 10 mg/litru urină ; la 2,4 g/24 ore, 17 mg/litru sînge și 115 mg/litru urină. 2. În intoxicațiile severe (absorbție de peste 10 g meprobamat) concentrațiile sînt : 50—300 mg/litru sînge și 100—1 000 mg/litru urină (în funcție de diureză). 3. Majoritatea intoxicațiilor intră în comă la peste 100 mg meprobamat/litru sînge, iar la aproximativ 50 mg/litru sînge, intoxicații își păstrează, de obicei, starea de veghe. Peste 200 mg/litru sînge survine insuficiența circulatorie acută. Evoluția poate fi fatală și la concentrații plasmatice inferioare dacă s-au ingerat, concomitent, alcool sau barbiturice.

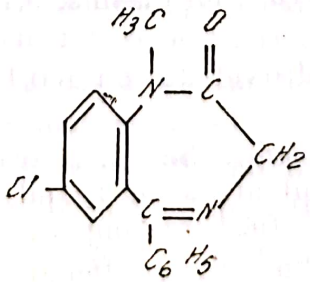
II.6.11. BENZODIAZEPINELE



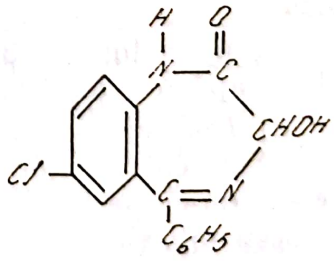
Benzo(f)diazepine 1,4



Clordiazepoxidul (Napoton, Librium, Elenium)



Diazepamul (Valium, Seduxen, Faustan)



Oxazepamul (Adumbran, Serax, Seresta)

Alte bentodiazepine, utilizate ca tranchilizante minore, unele posedînd și activitate hipnotică, sînt prezentate în tabelul 18.

Tabelul 18

Structura chimică a unor benzodiazepine

Benzodiazepina	R_7	R_1	R_{2a}, R_{2b}	R_3	R'_2
Clorazepat (Azene, Tranxene)	—Cl	—H	—OH, —OH	—COOH	—H
Lorazepam (Ativan, Tavror)	—Cl	—H	=O	—OH	—Cl
Prazepam (Verstran)	—Cl	$-CH_2-CH\langle{}^{CH_2}_{CH_2}$	=O	—H	—H
Flurazepam (Dalmane)	—Cl	$-(CH_2)_2-N(C_2H_5)_2$	=O	—H	—F
Medazepam (Nobrium, Rudotel)	—Cl	$-CH_3$	—H, —H	—H	—H
Nitrazepam (Mogadan, Mogadon)	$-NO_2$	—H	=O	—H	—H
Nimetrazepam	$-NO_2$	$-CH_3$	=O	—H	—H
Flunitrazepam (Rohypnol)	$-NO_2$	$-CH_3$	=O	—H	—F

A. **Izolare**

a) *Izolarea clordiazepoxidului și a benzodiazepinelor cu R_1.* Se alcalinizează la pH 10 cu carbonat alcalin, 25 ml urină și se extrag de două ori cu cu cîte 50 ml eter, dicloretan sau amestec dicloretan : acetat de etil (2 : 1). Se filtrează extractele organice reunite pe un filtru uscat și se spală filtrul cu puțin solvent. Se evaporă filtratul la sec pe baia de apă.

b) *Izolarea diazepamului și a altor benzodiazepine cu R_1 = alchil.* Se aduc 25 ml urină la pH 6,8—7,0 cu tampon fosfat și se extrag de două ori cu cîte 50 ml cloroform, agitînd cîteva minute. Se filtrează extractele cloroformice reunite pe un filtru peste cărbune activat și se spală filtrul cu puțin cloroform. Se evaporă filtratul la sec pe baia de apă la 50—60°.

Se procedează identic pentru 2 ml plasmă, 0,1 ml tampon și 25 ml cloroform.

Tampon fosfat : 30 ml hidroxid de sodiu 0,1 N, 50 ml fosfat dipotasic 0,1 N, apă q.s. ad 100 ml.

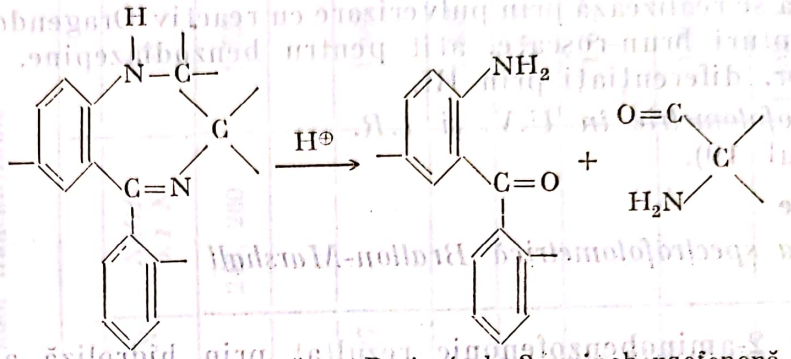
c) *Izolarea 2-aminobenzofenonei.* Se hidrolizează, într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent, 25 ml urină cu 10 ml acid clorhidric concentrat, încălzindu-se pe baia de apă la fierbere timp de 30 minute. Se răcește și se filtrează (dacă este cazul). Se neutralizează lichidul cu hidroxid de sodiu 30% și se extrage de două ori cu cîte 50 ml eter. Se filtrează extractele reunite pe sulfat de sodiu anhidru și se evaporă la sec pe baia de apă.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

Benzodiazepinele, spre deosebire de majoritatea medicamentelor, nu pot fi puse în evidență, în produsele biologice, printr-o metodă simplă și directă. Metoda de identificare rapidă este indirectă și se bazează pe reacția de diazotare și cuplare, caracteristică aminelor primare aromatice. Într-adevăr, prin hidroliză acidă la încălzire, clordiazepoxidul și benzodiazepinele cu $R_1 = H$ (oxazepamul, clorazepatul, lorazepamul, nitrazepamul) și metaboliții lor formează derivați ai 2-aminobenzofenonei, extractibili cu solvenți organici:



Derivat de benzodiazepină Derivat de 2-aminobenzofenonă

Diazotarea nu poate fi aplicată la toate benzodiazepinele ca atare. Astfel:

— benzodiazepinele cu R_1 = alchil (diazepam, prazepam, flurazepam, medazepam, nimetrazepam, flunitrazepam), formează, prin hidroliză, amine aromatice secundare, nediazotabile. În organism însă, aceste benzodiazepine suferă, parțial, N_1-dezalchilare, astfel încît metaboliții N_1-dezalchilați, prezenți în urină și sînge, pot fi identificați după hidroliză acidă, prin diazotare și cuplare. Ele însă nu pot fi identificate prin această metodă în lichide gastrice și corpuri delicte (medicamente), deoarece se găsesc în stare nemetabolizată, nediazotabilă.

— medazepamul posedă două grupări metilenice între N_1 și N_4 (avînd R_{2a}, R_{2b} și $R_3 = H$). Gruparea CH_2 din poziția 2 mărește stabilitatea legăturii $N_1—C_2$, care nu poate fi scindată prin hidroliză acidă (în condițiile metodei), astfel încît nici metabolitul N-demetilat nu se scindează cu formare de derivat 2-aminobenzofenonic. În schimb, printre metaboliții medazepamului se găsește și un compus N-demetilat, avînd în C_2 un alcool secundar, ceea ce labilizează legătura $N_1 — C_2$ și permite scindarea compusului.

a) *Reacția Bratton-Marshall*: 2-aminobenzofenona, avînd gruparea NH_2 liberă, poate fi diazotată și cuplată, formînd un azoderivat colorat, colorimetrabil. De asemenea, reziduul obținut prin extragere directă, hidrolizat prin tratare cu 2 ml acid clorhidric 4 N și încălzire pe baia de apă la fierbere timp de 15 minute, apoi răcit, dă această reacție. Se diazotează reziduul de la izolarea 2-aminobenzofenonei reluat cu 1 ml acid clorhidric 10% sau reziduul de la extracția directă, prin tratare cu 0,1 ml azotit de sodiu 1%. După 10 minute se elimină excesul de nitrit cu 2 ml uree 10% sau sulfamat 2%. Se agită și se lasă în repaus 2 minute, apoi se adaugă 0,1 ml N-naftiletilendiamină (NED) 0,1%, cînd se obține o coloratie roz-violacee. Această reacție nu este dată de diazepamul ca atare, ci numai de metabolitul său N-demetilat.

Scanned with OKEN Scanner

Pe același principiu se bazează și *reacția Pelzer* (cuplare cu alfanaftol, cînd se obține o colorație roz, colorimetrabilă la $\lambda = 492$) și reacția Tréfouël (cuplare cu N-alfanaftil-N°, N² dietilpropilendiamină, cînd se obține o colorație violetă, colorimetrabilă la $\lambda = 540$ nm.).

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul de la extragerea directă (fără hidroliză acidă) în 0,2 ml cloroform și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sînt : cloroform : metanol : toluen (10 : 1 : 4) și metanol : acetonă : trietanolamină (1 : 1 : 0,3).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu reactiv Dragendorff modificat, cînd apar spoturi brun-roșcate, atît pentru benzodiazepine, cît și pentru metaboliții lor, diferențiați prin Rf.

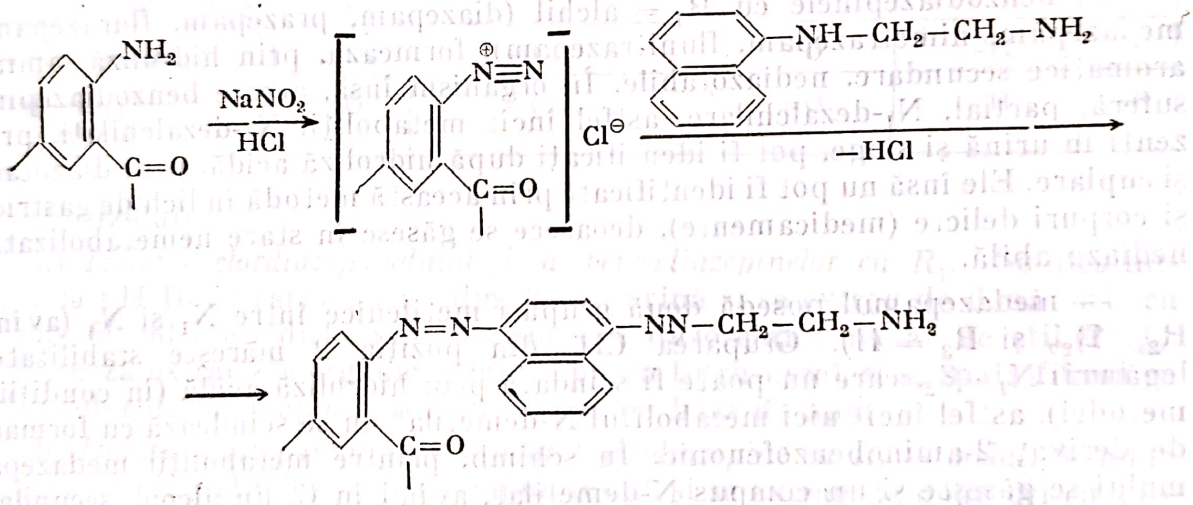
3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.* (tabelul 19).

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică Bratton-Marshall*

Principiu

Derivatul 2-aminobenzofenonic rezultat prin hidroliză acidă la cald este diazotat și cuplat cu N-naftiletilendiamină, cu formarea unui azoderivat roz-violaceu, colorimetrabil :



Reactivi

Aceeași ca la identificarea prin această reacție, în plus soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,2500 g benzodiazepină și se aduc la 100 ml cu apă distilată (1 ml = 2,5 mg). Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată în proporție de 1 : 10 (1 ml = 250 μg).

Modul de lucru

Se dizolvă reziduul obținut prin extragere cu solvenți după hidroliză acidă în 2 ml acid clorhidric 2 N și se aduc cantitativ cu apă într-un balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluție și se adaugă 0,5 ml acid clorhidric 2 N și 0,1 ml $NaNO_2$ 1%. Se agită și se lasă în repaus 10 minute, se adaugă 1 ml uree 10%, se agită și după 5 minute se adaugă 0,1 ml NED 0,1%. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 550$ nm, în cuvă de 1 cm, față de o probă oarbă.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 19

Valorile absorbţiilor maxime în U.V. şi I.R. ale unor tranchilizante
(după Clarke, 1971, 1975)

Tranchilizantul	*U.V. (maxime)*						*I.R. (în KBr)*		
	Metanol	*Etanol*	H_2SO_4 *0,1 N*	*HCl 0,1 N*	*HCl 2 N*	*NaOH 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Clordiazepoxid bază			245, 306			243, 260	1 625	1 458	760
Clordiazepoxid HCl				246, 308					
Diazepam			241, 284, 359		242, 287		1 581	1 484	1 313
Oxazepam		230, 315					1 687	1 706	639, 830
Lorazepam				236, 329			1 676	1 149	1 317, 1 476
Prazepam			240, 285, 360				1 667	1 316	1 400, 1 473
Flurazepam	239, 284						1 400	1 450 762	1 480, 1 670
Nitrazepam		218, 250	277				1 352, 1 672	1 615	

Scanned with OKEN Scanner

Curba de etalonare se întocmește între 250 și 500 micrograme/probă (1—2 ml soluție standard de lucru, completat la 2 ml cu apă distilată). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 12,5 (deoarece s-a lucrat cu 1/12,5 din probă) obținîndu-se concentrația C a benzodiazepinei în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg benzodiazepină/100 ml plasmă sau 1 000 ml urină :

$$\text{mg benzodiazepină/100 ml plasmă} = \frac{C}{A \cdot 10}$$

$$\text{mg benzodiazepină/1 000 ml urină} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația benzodiazepinei în μg ;
A = volumul de plasmă (urină) luat în lucru, în ml.

Observații

1. Se poate folosi și reziduul obținut prin extragere directă (fără hidroliză), dacă se tratează cu 10 ml acid clorhidric 4 N, se hidrolizează prin încălzire 30 minute pe baia de apă la fierbere și după răcire se aduce cantitativ într-un balon cotat de 25 ml, cu apă distilată. 2. Metoda este interferată de toți metaboliții N-dezalchilați ai benzodiazepinelor.

2. *Metoda spectrofotometrică în U.V.*

Principiu

Diazepamul, clordiazepoxidul, oxazepamul prezintă două maxime de absorbție caracteristice. Diferența dintre valorile absorbției maxime și minime este proporțională cu concentrația benzodiazepinelor, permițînd dozarea lor din produsul de analizat. Sensibilitatea metodei este de 5 μg/ml.

Modul de lucru

Se dizolvă reziduul obținut prin extragerea a 25 ml urină (2 ml plasmă) cu solvenți organici, în 3 ml acid clorhidric 2 N.

Se măsoară absorția probelor la spectrofotometru, la lungimile de undă caracteristice fiecărei benzodiazepine, în cuva de 2 cm, față de HCl 2 N. În paralel se extrag și se prelucrează trei standarde cu concentrația de 40 μg/2 ml. Lungimile de undă caracteristice acestor trei benzodiazepine sînt : diazepam, 240 nm și 265 nm ; clordiazepoxid, 245 nm și 290 nm ; oxazepam 232 nm și 282 nm.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg benzodiazepină/100 ml plasmă sau 1 000 ml urină :

$$\text{mg benzodiazepină/100 ml plasmă} = 2 \cdot \frac{A_{MP} - A_{mp}}{A_{Ms} - A_{ms}}$$

$$\text{mg benzodiazepină/1 000 ml urină} = 1{,}6 \cdot \frac{A_{MP} - A_{mp}}{A_{Ms} - A_{ms}}$$

Scanned with OKEN Scanner

în care :

A_{Mp} = valoarea absorbției maxime a probei
A_{Ms} = valoarea absorbției maxime a standardului
A_{mp} = valoarea absorbției minime a probei
A_{ms} = valoarea absorbției minime a standardului
2 și 1,6 = coeficienți reprezentînd raportul dintre concentrația standardului și volumul de plasmă, respectiv de urină luat în lucru.

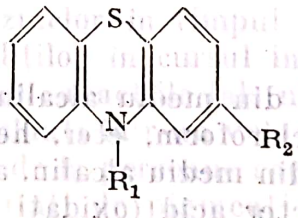
Observații.

1. Metoda este interferată de metaboliți. Prin izolarea benzodiazepinelor nemetabolizate, specificitatea metodei crește. 2. În locul unui singur etalon, se poate întocmi o curbă etalon cu o serie de etaloane, la care se raportează extincțiile citite pentru probe.

Interpretarea rezultatelor

1. În tratamentele cu o doză unică, orală, de 30 mg clordiazepoxid și 10 mg diazepam, concentrațiile sanguine maxime au fost de ordinul a 1—2 mg clordiazepoxid/litru sînge și a sutelor de micrograme diazepam/litru sînge. În tratamentele cu doze zilnice de 30 mg clordiazepoxid sau diazepam, concentrațiile maxime au fost de ordinul sutelor de micrograme/litru sînge. 2. În intoxicațiile severe sau mortale, concentrațiile sanguine au fost de 2—20—30 mg clordiazepoxid sau diazepam/litru sînge. 3. Concentrația nordiazepamului — principalul metabolit al diazepamului — este mai scăzută la începutul intoxicației și mai crescută în stadiul final, decît concentrația diazepamului.

II.6.12. FENOTIAZINELE



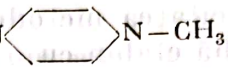
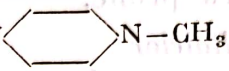
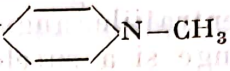
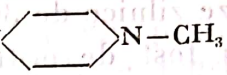
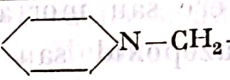
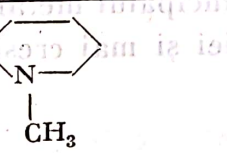
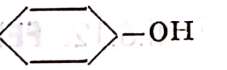
Principalele fenotiazine sînt prezentate în tabelul 20.

Tabelul 20

Principalele fenotiazine

Fenotiazina	R_1	R_2
0	1	2
Promazina (Romtiazin, Sparin, Centractil, Delazin)	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	—H
Clorpromazina (Clordelazin, Plegomazin, Aminazin, Largactil, Thorazine, Propaphenin, Megaphen)	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	—Cl

Tabelul 20 (continuare)

0	1	2
Levomepromazina (Nozinan, Tisercin)	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$	$-OCH_3$
Alimemazina (Vallergan, Temaril, Théralène)	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$	$-H$
Proclorperazina (Emetiral, Stematil)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-Cl$
Trifluoperazina (Stelazin, Triftazin)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-CF_3$
Tioproperazina (Majeptil)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-SO_2N(CH_3)_2$
Tietilperazina (Torecan)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-S-C_2H_5$
Flufenazina (Moditen)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-CF_3$
Tioridazina (Melleril, Melleretten	$-(CH_2)_2-$ 	$-S-CH_3$
Periciazina (Neuleptil)	$-(CH_2)_3-N$ 	$-CN$

A. **Izolare**

Fenotiazinele se izolează din mediu alcalin şi, parţial, din mediu acid, cu diclormetan, dicloretan, cloroform, eter, hexan. Metaboliţii cu caracter alcalin (demetilaţi) se extrag din mediu alcalin, alături de fenotiazina netransformată. Metaboliţii cu caracter acid (oxidaţi la catena laterală) se extrag din mediu acid. Metaboliţii conjugaţi se extrag după o prealabilă hidroliză acidă, astfel încît pentru organe şi sînge este preferabil să se execute hidroliza, pentru a regăsi şi produşii conjugaţi.

a) *Izolare din urină, lichide gastrice*: se iau, într-o pîlnie de separare, 50 ml urină (lichide gastrice filtrate) şi se alcalinizează la *p*H 10 cu hidroxid de sodiu 20%. Se adaugă 80 ml diclormetan, dicloretan sau cloroform şi se agită puternic 3 minute. Se repetă extragerea cu 80 ml solvent. Se spală gazele organice de două ori cu cîte 20 ml apă distilată, se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă la sec sau se foloseşte filtratul.

b) *Izolare din sînge*. 1. Se tratează 10 ml sînge total cu 10 ml acid tricloracetic 20%, se filtrează, se alcalinizează la *p*H 10 cu hidroxid de sodiu 20% şi se extrag de două ori cu cîte 50 ml cloroform sau hexan. Se filtrează extractele organice reunite pe un filtru uscat şi se evaporă la sec pe baia de

apă. 2. Se tratează 5 ml ser cu 15 ml apă distilată, 1 ml hidroxid de sodiu 4% și 25 ml diclormetan. Se agită puternic 10 minute. Se centrifughează și se elimină, prin aspirare, faza apoasă supernatantă. Se folosește faza organică ca atare sau reziduul.

c) *Izolare din organe și sînge.* Se macerează 10 g ficat cu 10 ml apă și se adaugă 13,5 ml acid clorhidric concentrat. Se încălzește amestecul pe baia de apă timp de 5 minute, apoi se răcește în gheață. Se adaugă 12 ml hidroxid de potasiu 60% spălat în prealabil cu eter, se agită și se verifică dacă pH-ul este alcalin. Se răcește și se extrage de două ori cu cîte 50 ml eter. Extractele eterice reunite se agită cu 10 ml hidroxid de sodiu 2,5%. Se îndepărtează faza apoasă, iar faza eterică se spală cu două ori cu cîte 10 ml apă. Extractele eterice reunite se evaporă la sec. Se procedează identic pentru 10 ml sînge. 2 ml apă, 8 ml HCl conc.

B. **Identificare**

1. *Teste orientative (fără izolare)*

a) *Testul cu reactiv Forrest „universal"* (*reactiv F.P.N.*) : se adaugă la 1 ml urină, 1 ml reactiv Forrest. Se obțin imediat colorații portocalii, roz, roșii, violete, culoarea depinzînd de natura fenotiazinei, iar intensitatea colorației fiind oarecum proporțională cu concentrația acesteia. Reacția este pozitivă și pentru salicilați, PAS, benzodiazepine, pigmenți biliari. Reacția poate fi executată și prin suprapunerea unei picături de reactiv F.P.N. peste o picătură de urină spotată pe o hîrtie de filtru și uscată. Reacția este mai sensibilă dacă se extrag 10 ml urină alcalinizată cu hidroxid de sodiu, cu 20 ml eter, faza eterică evaporată, iar reziduul eteric reluat în 2—3 picături etanol și spotat pe hîrtie, peste care se suprapun 2—3 picături reactiv Forrest (*tehnica Noir-falise*).

Reactiv Forrest („*universal*") : clorură ferică 5% 5 ml, acid percloric d = 1,67, 20% (v/v) 45 ml, acid azotic d = 1,67, 50%, (v/v), 50 ml.

Testul cu reactiv Forrest este utilizat pentru depistare intoxicației cu fenotiazine (un test negativ indică absența absorbției masive de fenotiazine) ; urmărirea eliminării fenotiazinelor în timpul spălăturii gastrice ; urmărirea eliminării urinare a metaboliților în cursul intoxicației fenotiazinice. Dezavantajele testului Forrest sînt : reacțiile fals negative, cînd metaboliții fenotiazinici sînt în doze mici, diluați într-un volum mare de urină ; reacțiile fals pozitive, cînd urina provine de la persoane care au ingerat salicilați sau PAS sau cînd conține mari cantități de pigmenți biliari, estrogeni, indican (de altfel, chiar unele urini „normale" dau reacție pozitivă cu reactiv Forrest.

b) *Spot — testul cu acid azotic concentrat* ; se aplică 1—2 picături de urină pe o hîrtie de filtru, marcînd cu creionul conturul petei. Se usucă și se suprapune o picătură de acid azotic concentrat, cînd apar pe conturul creionat inele roz, roșii, violete, în raport cu natura fenotiazinei și concentrația sa. La concentrații foarte scăzute observarea hîrtiei se face prin transparență.

c) *Testul cu acid sulfuric și clorură ferică* : se adaugă la 1 ml urină, 1 ml reactiv compus din 80 ml acid sulfuric 10% și 20 ml clorură ferică 5%, cînd se obține o colorație roz-mov.

d) *Testul pentru tioridazină* : se adaugă la 1 ml urină, 1 ml reactiv compus din 98 ml acid sulfuric 30% și 2 ml clorură ferică 5%, cînd apare, în prezența tioridazinei, o colorație roz deschis care se intensifică și trece în albastru.

Toate aceste teste pot fi executate și pe reziduu sau pe soluția extractivă.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Reacții de culoare (pe reziduu sau soluția extractivă)*

a) *Reacția cu chinhidronă și acid fosforic*: într-o eprubetă se introduc 15 ml soluție extractivă obținută de la extragerea urinii (v. Izolare, pt. a) și 5 ml reactiv chinhidronă — acid fosforic. Se agită puternic un minut. Apariția unei colorații de la roșu-portocaliu la violet-albastru în faza inferioară acidă indică prezența fenotiazinelor. Colorațiile sînt stabile și au absorbții maxime cuprinse între 497 și 638 nm, principalele fenotiazine având următoarele absorbții maxime:

Clorpromazina	527 nm	Tioproperazina	509 nm
Levomepromazina	567 nm	Tietilperazina	636 nm
Alimemazina	510 nm	Flufenazina	500 nm
Proclorpromazina	528 nm	Tioridazina	636 nm
Trifluoperazina	497 nm	Prometazina	512 nm

Numai în prezența cantităților mai mari de clorprotixenă, faza acidă inferioară se colorează în portocaliu palid. În acest caz, expunerea soluției acide în lumina U.V. pune în evidență o fluorescență intensă, roz-galbenă, datorată clorprotixenei, iar absorbția maximă este la 492, deci în afara zonei de absorbție a fenotiazinelor.

Reacția se poate aplica și pe reziduu, care la tratare cu 0,2—0,3 ml reactiv chinhidronă-acid fosforic dezvoltă colorațiile menționate, datorate fenotiazinelor.

Reactiv chinhidronă-acid fosforic: se amestecă extemporaneu 1 ml soluție chinhidronă 0,001 M sau benzoparachinonă 0,001 M în diclormetan și 4 ml acid ortofosforic d = 1,71. Masa moleculară a chinhidronei = 218 g, iar a benzoparachinonei = 108 g.

b) *Reacția de diferențiere a clorpromazinei de prometazină*: reziduul tratat cu sulfat mercuric 1% dă o coloratie roșie în prezența prometazinei, nu însă în prezența clorpromazinei.

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml metanol și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu probele martor.

Sistemele de migrare sînt: cloroform : metanol (9 : ș); ciclohexan : benzen : dietilamină (7,5 : 1,5 : 1); acetonă + amoniac concentrat (99 : 1); n. butanol : apă : amoniac concentrat (9 : 2,5 : 0,2); acetonă : apă : amoniac (9 : 3 : 0,1).

Revelarea se realizează prin: pulverizare cu: reactiv Forrest; acid sulfuric; acid percloric, reactiv chinhidronă-acid fosforic și expunere la vapori de acid clorhidric; reactiv Dragendorf modificat.

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(tabelul 21)

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (tehnica Meunier)*

Principiu

Fenotiazinele, fiind puternic donori de electroni, reacționează cu acceptorii de electroni (oxidanți anorganici și organici) în mediu puternic acid (acizi sulfuric, clorhidric, azotic). Colorațiile produse de oxidanții anorganici puternici sînt nestabile, deoarece are loc o trecere de la forma inițială de radical

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 21

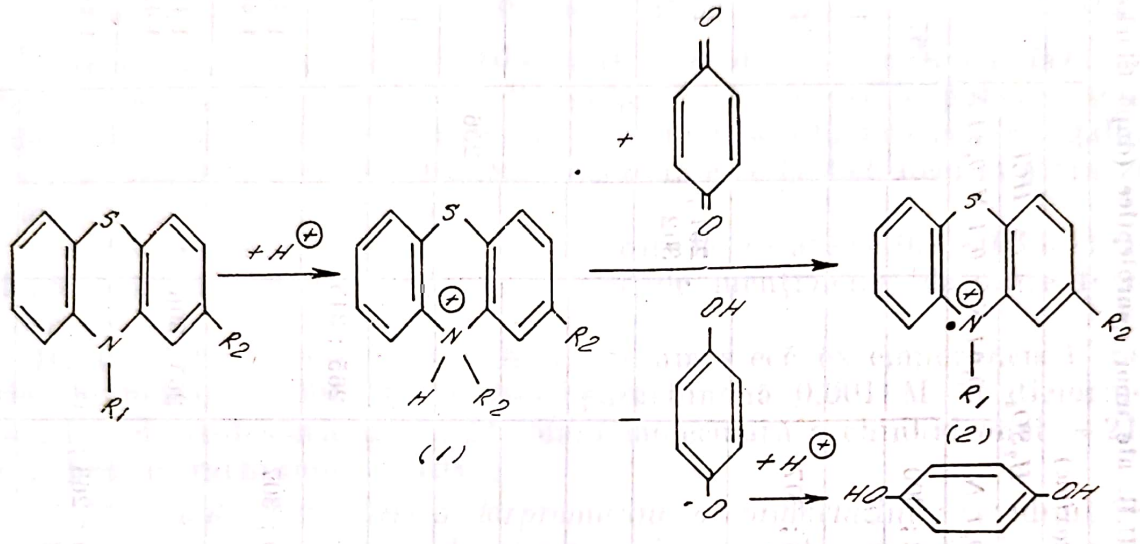
Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și U.R. ale unor neuroleptice (după Clarke, 1971, 1975)

Neurolepticul	*U.V. (maxime)*							*(I.R. în KBr)*		
	Apă	*Etanol*	*Etanol : apă 1 : 1*	H_2SO_4		*HCl*		*A*	*B*	*C*
				0,1 N	*0,01 N*	*0,1 N*	*0,01 N*			
Promazina bază				252 ; 300				757 ; 1 459	1 222	
Promazina HCl	251 ; 301		255 ; 303					1 462	748	1 254
Clorpromazina				255 ; 307				1 462	747	1 240 ; 1 402 ; 1 561
Levomepromazina		255 ; 310				251 ; 302		1 460	1 446 1 587	1 269
Proclorperazina bază		258								
Proclorperazina meleat			257 ; 312							
Trifluoperazina bază							256			
Trifluoperazina HCl								1 106	1 426	1 316
Tioproperazina					265 ; 315					
Tietilperazina		264 ; 316		255 ; 307				1 356 ; 1 462	1 563	
Flufenazina					265 ; 306			1 115 ; 1 425	1 325	1 142 ; 1 161
Tioridazina		263 ; 314		230 ; 263 ; 313				1 460	1 402	750
Periciazina				233 ; 268				1 464	736	811 ; 1 066

Scanned with OKEN Scanner

la alți compuși de oxidare sau oxigenare, care diferă de radicalul cationic inițial prin proprietățile lor spectrofotometrice. De asemenea, acizii tari au ei înșiși capacitate oxidantă, putînd induce reacții colorate și cu alte medicamente (de exemplu cu dibenzcicloheptadienele). Pentru a evita aceste inconveniente, sînt preferabili oxidanții organici, mai blînzi, ca chinhidrona și benzoparachinona, precum și mediul de acid fosforic, cu un pK_a mai mic decît alți acizi uzuali.

Mecanismul reacției, propus de Meunier, este următorul : fenotiazina, acceptînd protonul de la acidul fosforic, trece într-un derivat cationic (1), cu azot cuaternar. Acesta cedează protonul chinhidronei sau benzoparachinonei, rezultînd radicalul cationic (2), colorat. Concomitent benzoparachinona se hidrogenează în două trepte, ajungînd în final la hidrochinonă :



Reactivi

1. Reactiv benzoparachinonă-acid fosforic (v. Identificare). 2. Soluție standard stoc : se aduc 0,1000 g fenotiazină la 50 ml cu metanol (1 ml = 2 mg). 3. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc în proporție de 1 : 100 (1 ml = 20 μg).

Modul de lucru

Se reia cu metanol reziduul de la extragerea cu solvenți și se aduce la 25 ml într-un balon cotat. Se iau 2,5 ml din această soluție și se adaugă 0,2 ml reactiv benzoparachinonă-acid fosforic. Se citește extincția la spectrofotometru, la lungimea de undă caracteristică fiecărei fenotiazine (v. Identificare).

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 50 micrograme/2,5 ml metanol (0,25—2,5 ml soluție standard de lucru, completat la 2,5 ml cu metanol). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 10 (deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă) obținîndu-se concentrația C a fenotiazinei, în μg în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sînge sau mg/1 000 ml urină :

$$\text{mg fenotiazină/100 ml sînge} = \frac{C}{A \cdot 10}$$

$$\text{mg fenotiazină/1 000 ml urină} = \frac{C}{A}$$

în care:

C = concentrația fenotiazinei, în μg;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

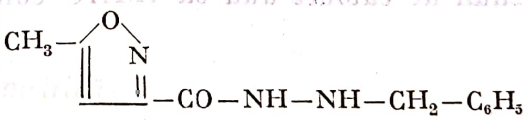
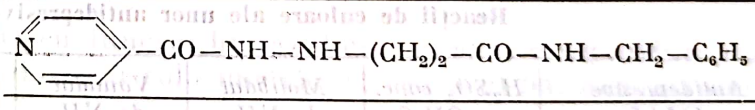
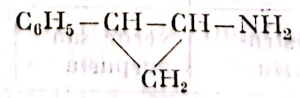
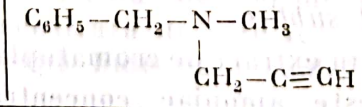
1. În tratamenet cu o doză unică orală, de 25—150 mg clorpromazină, concentrațiile sanguine au fost de ordinul microgramelor/litru sînge, în tratamente prelungite cu doze zilnice de 600 mg/zi, de ordinul zecilor de micrograme/litru sînge, iar în tratamente psihiatrice cu doze de 1—2 g, de 150—300 μg/litru și chiar 1 000 μg/litru sînge. 2. În intoxicații cu 1,5—2 g clorpromazină concentrațiile sanguine au fost de 0,5—1,5 mg/litru sînge, iar în cazuri de decese de 1—44 mg/litru sînge și de 54—2 110 (în medie 366) mg/kg ficat.

II.6.13. ANTIDEPRESIVELE INHIBITOARE ALE MONOAMINOOXIDAZEI (IMAO)

Principalele antidepresive inhibitoare ale monoaminooxidazei (IMAO) sînt prezentate în tabelul 22.

Tabelul 22

Principalele antidepresive IMAO

Antidepresive IMAO	*Formula*
Hidrazide Izocarboxazide (Marplan)	
Nialamida (Niamida)	
Hidrazine Fenelzina (Nardelzin, Nardil)	$C_6H_5-CH_2-CH_2-NH-NH_2$
Feniprazina (Catron)	$C_6H_5-CH_2-CH(CH_3)-NH-NH_2$
Amine Tranilcipromina (Transamina, Tilciprin, Parnate)	
Pargilina	

A. **Izolare**

Antidepresivele IMAO se izolează din mediu alcalin cu solvenți organici.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) *Reacția cu săruri de tetrazoliu* : Antidepresivele IMAO cu funcție hidrazidică sau hidrazinică au capacitate reducătoare asupra sărurilor de tetrazoliu (albastru de tetrazoliu). Se iau într-o eprubetă de centrifugă cu dop rodat 2 ml urină, 2 ml tampon borat *p*H 10 (borat de sodiu, 3,813 g%) și 10 ml diclormetan. Se agită mecanic timp de 10 minute, se centrifughează, se îndepărtează, prin sifonare, faza apoasă. Se spală faza organică cu cîțiva mililitri sulfat de sodiu, soluție saturată. Se îndepărtează faza apoasă. Se usucă faza organică pe sulfat de sodiu anhidru. Se evaporă faza organică. Se reia reziduul cu 3 ml cloroform. Se adaugă 0,1 ml reactiv albastru de tetrazoliu și 0,1 ml reactiv alcalinizant, se agită și se menține la întuneric 10 minute, cînd se dezvoltă o colorație roz-violacee.

Metoda se pretează pentru dozare. În acest caz, se tratează în paralel, atît o soluție standard conținînd antidepresivul IMAO cercetat, în concentrația de 25 μg/ml, cît și o urină martor, provenind de la o persoană netratată cu IMAO (în aceste condiții, se observă, în această urină, o ușoară colorație roz, nesemnificativă).

Reactiv albastru de tetrazoliu : albastru de tetrazoliu (clorură de 3,3′-dianisol-4,4′, 3,5-difeniltetrazoliu), 0,125 g, metanol q.s. ad 100 ml. Se conservă o lună la +4°C, ferit de lumină.

Reactiv alcalinizant : hidroxid de potasiu, 0,02 M în metanol. Se observă o lună la +4°C.

b) *Reacția de reducere a* Fe^{3+} *la* Fe^{2+} (v. Dozare).

c) *Reactivii uzuali de culoare dau cu IMAO* colorațiile prezentate în tabelul 23.

Tabelul 23

Reacții de culoare ale unor antidepresive IMAO

Antidepresive IMAO	H_2SO_4 *conc.* + CH_2O	*Molibdat de* NH_4	*Vanadat de* NH_4	*Reacția Vitali*
Nialamida		brun-deschis	roșu	—/—/galben
Fenelzina		albastru-cenușiu	cenușiu	galben/brun/brun-închis
Tranileipromina	roșu → brun	albastru-cenușiu	verde sau purpuriu	—/galben/brun

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se spotează 0,2—0,5 ml din extract pe cromatoplacă în paralel cu martori. Sistemul de migrare este amoniac concentrat : metanol (1,5 : 100).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu permanganat de K(pentru izocarboxazidă) și iodoplatinat acidulat (pentru fenelzină, nialamidă, tranilciprominā și pargilină).

3. *Spectrofotometric în U.V. și I.R.*
(tabelul 24)

Tabelul 24

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale unor antidepresive IMAO
(după Clarke)

Antidepresive IMAO	*U.V. (maxime)*					*I.R. (în KBr)*		
	Etanol ; apă	*HCl 0,1 N*	*H_2SO_4 0,2 N*	*H_2SO_4 0,1 N*	*NaOH 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Izocarboxazida					272	756 1 670	710	
Nialamida				264	238 305			
Fenelzina bază				247 252 257 262		1 016	1 108	1 050
Fenelzina sulfat	258							
Tranilciprominā sulfat			252 264 271			1 120	1 497	690
Pargilina		251 256 261 268				697	746	1 458

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Antidepresivele IMAO cu funcție hidrazidică și hidrazinică reduc ionul feric la ion feros, care se dozează colorimetric cu ajutorul batofenantrolinei.

Reactivi

1. Clorură de sodiu 0,9%. 2. Tampon borat-acid clorhidric *p*H 8. 3. Hidroxid de sodiu 2 N. 4. Acid clorhidric 0,2 N. 5. Acetat de amoniu soluție saturată. 6. Soluție de batofenantrolină. Se iau într-o eprubetă termorezistentă 100 mg batofenantrolină (4,7-difenil-1,10-fenantrolină), se adaugă 0,5 ml acid clorosulfonic și se fierbe 1/2 minut. Se răcește și se adaugă cu atenție 10 ml apă bidistilată. Se încălzește pe baia de apă la fierbere pînă la dizolvarea precipitatului. Se transvazează într-un balon Erlenmeyer conținînd 150 ml apă bidistilată, se ajustează la *p*H 4 cu hidroxid de sodiu 2 N și se aduce în balon cotat de 200 ml, completînd la semn cu apă bidistilată. 7. Soluție concentrată de sare ferică. Se dizolvă 1,727 g sulfat feriamoniacal în 100 ml apă bidistilată acidulată cu 0,5 ml acid sulfuric

Scanned with OKEN Scanner

concentrat (1 ml = 2 mg Fe^{3+}). 8. Soluție diluată de sare ferică. Se prepară din 0,75 ml soluție concentrată, 0,5 ml acid clorhidric concentrat și apă bidistilată q.s. ad 50 ml.

Modul de lucru

Într-o pîlnie de separare se iau 5 ml sînge, ser, l.c.r., urină (urina trebuie alcalinizată la *p*H 8 cu NaOH 2 N); 5 ml clorură de sodiu 0,9%; 1 ml tampon *p*H 8; 25 ml cloroform. Se agită puternic 5 minute, se centrifughează la turații mari, se elimină faza apoasă prin sifonare, se extrage de două ori faza cloroformică cu cîte 5 ml acid clorhidric 0,2 N și se reunesc soluțiile acide extractive.

Într-o eprubetă se iau : 1 ml soluție diluată de sare ferică, 0,5 ml acetat de amoniu soluție saturată, 0,5 ml soluție de batofenantrolină, 5 ml soluție acidă extractivă. Se măsoară extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 540$ nm, în cuva de 1 cm, față de o probă oarbă. Se compară cu o scară etalon realizată cu concentrații de IMAO în raport cu concentrația observată la identificare.

Observații

1. Acidul clorosulfonic este toxic. 2. Reacția este interferată de izoniazidă. 3. Nu se iau în considerare decît extincțiile care depășesc 0,100, deoarece numeroase substanțe reducătoare prezente în organism (glutation, cisteină, acid ascorbic, acid lactic, acid piruvic) dau colorații slabe în condițiile metodei.

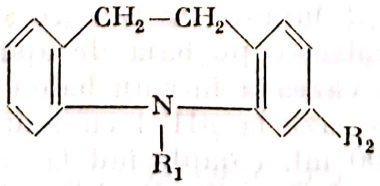
Interpretarea rezultatelor

1. În tratamente cu o doză unică, orală, de 30 mg IMAO concentrațiile sanguine au fost de ordinul microgramelor sau zecilor de micrograme/litru sînge. 2. În intoxicații severe sau mortale, concentrațiile sanguine au fost de ordinul miligramelor/litru sînge și zecilor de miligrame/litru urină.

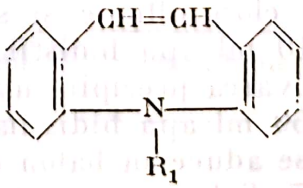
II.6.14. ANTIDEPRESIVELE TRICICLICE

Principalele antidepresive triciclice sînt :

— *derivați dihidrodibenzazepinici și dibenzazepinici* (tabelul 25) cu următoarele structuri :



Structură dihidrodibenzazepinică (A)



Structură dibenzazepinică (B)

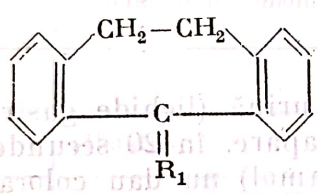
Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 25

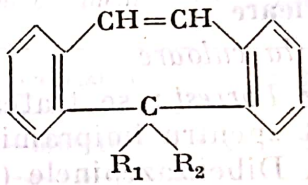
Derivați dihidrodibenzazepinici și dibenzazepinici

Antidepresivul triciclic	*Structura*	R_1	R_2
Imipramina (Antideprin, Tofranil, Melipramin, Imizin)	A	—H	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$
Desipramina (Pertofan)	A	—H	$-(CH_2)_3-NHCH_3$
Tripramina (Surmontil, Sapilent, Herphoral)	A	—H	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$
Clomipramina (Anafranil)	A	—Cl	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$
Opripramol (Insidon)	B	—	$-(CH_2)_3-N$ $N-CH_2-CH_2OH$

— *derivați dibenzcicloheptadienici și dibenzcicloheptatrienici* (tabelul 26) cu următoarele structuri:



Structură dibenzcicloheptadienică (C)



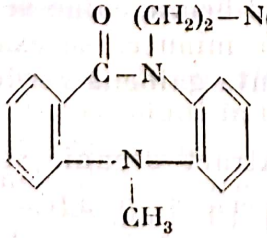
Structură dibenzcicloheptatrienică (D)

Tabelul 26

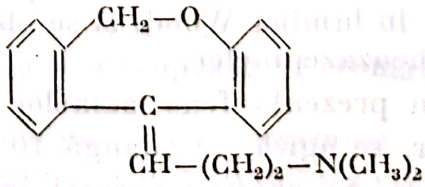
Derivați dibenzciloheptadienici și dibenzciloheptatrienici

Antidepresivul triciclic	*Structura*	R_1	R_2
Amitriptilina (Laroxyl, Triptizol, Teperin)	C	—	$=CH-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$
Nortriptilina (Psihostil)	C	—	$=CH-(CH_2)_2-NHCH_3$
Protriptilina (Vivactil)	D	—H	$(-CH_2)_3-NHCH_3$

— *derivați cu structură triciclică înrudită*, cu reprezentanții: Dibenzepina (Noveril) și Doxepina (Aponal, Sinequan):



Dibenzepina



Doxepina

Scanned with OKEN Scanner

I. *Dihidrodibenzazepine și dibenzepina*

A. **Izolarea**

Antidepresivele triciclice se izolează din mediu alcalin cu solvenți organici.

a) *Izolare din urină :* se agită puternic timp de cîteva minute, 100 ml urină, 20 ml hidroxid de sodiu 40% și 50 ml dicloretan. Se centrifughează, se îndepărtează faza apoasă supernatantă și se spală faza organică cu 40 ml apă distilată. Se trece faza organică pe un filtru conținînd sulfat de sodiu anhidru. Se spală filtrul cu puțin solvent. O parte din filtrant se evaporă la sec, altă parte servește ca atare pentru identificare.

b) *Izolare din sînge :* se agită timp de cîteva minute, 5 ml ser (plasmă), 2 ml hidroxid de sodiu 40% și 20 ml hexan. Se centrifughează, se îndepărtează faza apoasă și se spală faza organică de două ori cu cîte 5 ml apă distilată.

c) *Izolare din organe :* se triturează 5 g organe cu nisip purificat, se adaugă 0,5 g oxid de magneziu și 15 g sulfat de sodiu anhidru și se omogenizează. Se trece amestecul într-un balon Erlenmeyer cu dop rodat și se extrage prin agitare puternică timp de 10 minute cu 25 ml acetonă (cloroform). Se spală solventul și se repetă extragerea de două ori. Extractele organice reunite sînt filtrate pe filtru uscat. Filtratul este evaporat la sec.

B. **Identificare**

1. *Reacții la culoare*

a) *Reacția Forrest :* se tratează 1 ml urină (lichide gastrice) cu 2 ml reactiv Forrest „pentru imipramină", cînd apare, în 20 secunde, o colorație albastră-verde. Dibenzazepinele (tip Opipramol) nu dau colorație. Fenotiazinele dau o colorație roșie.

Reactiv Forrest „pentru imipramină„ : se amestecă volume egale de acid sulfuric 30% (v/v), acid azotic 50% (v/v), dicromat de potasiu 0,2% și acid percloric 20% (v/v).

b) *Reacția Bourdon-Nicaise :* se tratează 1 ml urină (lichide gastrice) cu 1 ml acid percloric d = 1,67 și cîteva picături de nitrit de sodiu 0,5%, cînd apare o colorație albastră. Fenotiazinele dezvoltă o colorație roșie-violetă, însă în exces de reactiv culoarea lor este mascată, lăsînd să apară culoarea albastră a dihidrodibenzazepinelor.

c) *Reacția Lemontay-Meunier (cu reactiv fosfoceric) :* se execută în prealabil o reacție de identificare a fenotiazinelor și, în raport cu absența sau prezența acestora, se procedează astfel :

1) În absența fenotiazinelor : peste 10 ml extract organic se adaugă 2 ml reactiv fosfoceric și se agită puternic 15 secunde. În prezența dihidrodibenzazepinelor și a dibezepinei se observă, în faza inferioară acidă, o culoare albastră. În prezența cantităților mari de dibenzazepine se observă o colorație galbenă-verde sau portocalie. După 5 minute, se examinează eprubeta în lumina Wood, și se observă o fluorescență galbenă-verde în prezența dibenzazepinelor.

2) În prezența fenotiazinelor : peste 10 ml extract organic se adaugă 6 ml eter, se agită, se adaugă 10 ml reactiv fosfoceric și se agită puternic 15 secunde. Se observă aceeași colorație ca mai sus, însă în cazul dihidro-

dibenzazepinelor culoarea albastră trece în verde, iar în cazul dibenzepinei, culoarea albastră virează lent spre violet. Eterul împiedică dezvoltarea coloraţiei fenotiazinelor, chiar în concentraţii de 1 g fenotiazină/litru (cu excepţia tioridazinei).

Reacţia se poate executa, pentru orientare, cu 1 ml urină (lichide gastrice) şi 3 ml reactiv fosfoceric, ceea ce permite urmărirea în dinamică a eliminării toxicului prin spălături gastrice, în intoxicaţia acută.

Reactiv fosfoceric : se dizolvă 3,162 g sulfat dublu de ceriu şi amoniu cu 2 molecule de apă în 50 ml apă ; după dizolvare se aduce la 500 ml cu acid fosforic d = 1,71.

d) *Diferenţierea dihidrodibenzazepinelor de dibenzepină :* se adaugă, la reziduul de evaporare, 2 ml acid fosforic d = 1,71 şi cîteva particule de plumb, cînd, în absenţa fenotiazinelor, se dezvoltă o coloraţie verde (dibenzepina) sau nu apare nici o coloraţie (dihidrodibenzazepine).

e) *Alte reacţii de culoare :* antidepresivele triciclice dau coloraţii cu unii reactivi uzuali de culoare (tabelul 27).

Tabelul 27

Reacţii de culoare a unor antidepresive triciclice

Antidepresivul triciclic	*Molidbat de amoniu*	*Vanadat de amoniu*	*Reacţia Vitali*
Imipramina		galben → albastru	verde/brun/brun
Desipramina	albastru	galben → albastru	verde/brun/brun
Trimipramina	albastru	albastru	verde/galben/galben
Clomipramina		prtocaliu → verde-albastru	verde/portocaliu/ portocaliu/
Opipramol	albastru → verde-albastru	galben-verde	galben/verde/galben
Amitriptilina	portocaliu → verde	brun	—/—/brun deschis
Nortriptilina	portocaliu-brun	brun → verde	roşu/—/brun
Protriptilina	purpuriu-închis	purpuriu-brun	galben/galben/brun
Dibenzepina		verde deschis → verde-cenuşiu	galben/galben/purpuriu
Doxepina	brun-închis	brun	brun/brun/brun

2. *Cromatografie în strat subţire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acetonă şi se stopează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sînt : metanol ; acetonă ; trietanolamină (1:1:0,3) sau hexan : metanol (5:6). Revelarea se realizează prin pulverizare cu : metavanadat de amoniu 0,3% în acid sulfuric 50% sau reactiv fosfoceric, cînd

se observă spoturi albastre. Se poate folosi, pentru derivații dihidrodibenzazepinici și dibenzepină, și sistemul de migrare comun bazelor azotate : amoniac concentrat ; metanol (1,5:100) și revelare cu iodoplatinat acidulat, iar pentru imipramină, sistemele hidroxid de amoniu : benzen ; dioxan (5 : 60 : 35) sau acid acetic ; etanol ; apă (30:50:20), și revelare cu iodoplatine.

După ce imipramina a fost identificată, este posibil să se separe metaboliții săi, utilizînd sistemul de migrare alcool absolut : apă distilată ; dietilamină (90:5:5) (deci solvenți foarte polari). Pentru spotare se poate folosi și urina neextrasă. Revelarea se realizează prin pulverizare cu acid percloric 60% conținînd 3% dintr-o soluție de nitrat de sodiu 0,5%. Se observă spoturi de imipramină (Rf aproximativ 0,63, (albastru), 10-hidroxi-imipramină (Rf 0,57, albastru, virează spre galben fluorescent), 2-hidroxi-imipramină (Rf 0,53, galben), desmetilimipramină (Rf 0,46 albastru), 2-hidroxi-desmetilimipramină (Rf 0,36, galben).

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.* (tabelul 28)

Tabelu 28

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale unor antidepresive triciclice (după Clarke)

Antidepresivul triciclic	*U.V. (maxime)*					*I.R. (în KBr)*		
	Apă	*Etanol*	*Metanol*	*HCl 0,1 N*	*H_2SO_4 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Imipramina					251	1 485	1 452	74 1 225
Desipramina					251 275	1 482	747	757 1 228
Trimipramina					250			
Trimipramina maleat						1 488	1 351	1 580
Clomipramina			252	252				
Opipramol					255 280			
Amitriptilina		242			240	752	742	75
Amitriptilina clorhidrică			239					
Nortriptilina clorhidrică	240		239			756	742	768 1 488
Protriptilina clorhidrică						753 799	772 1 470	
Dibenzepina					221			
Doxepina				292				

Scanned with OKEN Scanner

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Dihidrodibenzazepinele reacţionează în mediu acid cu oxidanţi printr-un mecanism de oxido-reducere asemănător celui de la fenotiazine. Pentru a evita interferenţa fenotiazinelor în această reacţie, se preferă reactivul fosfoceric (Lemontay-Meunier) care prezintă, în plus, avantajul stabilităţii.

Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 10 N (40%). 2. Hexan. 3. Eter. 4. Reactiv fosfoceric (v. Identificare). 5. Soluţie standard de dihidrodibenzazepină (0,001 M × 4) (de exemplu, pentru imipramină, cu masa moleculară = 318,6, se cîntăresc 0,1267 g imipramină şi se aduc la 100 ml cu apă distilată.

Modul de lucru

1) *Sînge* : într-o eprubetă cu dop rodat se iau 16 ml extract hexanic (proveniţi de la extragerea a 5 ml sînge — v. Izolare, pct. b) şi 4 ml reactiv fosfoceric. Se agită puternic 30 secunde, se centrifughează la turaţii mari şi se îndepărtează faza organică superioară. Se citeşte extincţia fazei acide inferioare, la spectrofotometru, la $\lambda = 630$ nm, în cuva de 1 cm.

2) *Urină (lichide gastrice)* : în absenţa fenotiazinelor, se iau, într-o eprubetă cu dop rodat, 10 ml extract hexanic (provenit de la extragerea a 100 ml urină — v. Izolare, pct. a) — şi 4 ml reactiv fosfoceric. Se continuă ca la sînge. Dacă coloraţia este prea intensă, se diluează cu reactiv fosfoceric. În prezenţa fenotiazinelor, se iau, într-o eprubetă cu dop rodat, 10 ml extracthexanic, 6 ml eter etilic, 10 ml reactiv fosfoceric. Se continuă ca la sînge. Se înmulţeşte extincţia citită cu 1,4, pentru a corecta diluţia realizată prin adaosul de eter, care a diluat faza acidă colorată. Dacă coloraţia este prea intensă, se diluează cu reactiv fosfoceric.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sînge sau mg/1 000 ml urină :

$$\text{mg imipramină/100 ml sînge} = \frac{316{,}8 \times 4 \times E_p \times V}{\text{C.E.M.} \times V_1 \times A} \cdot 100$$

$$\text{mg imipramină/1 000 ml urină} = \frac{316{,}8 \times 4 \times E_p \times V}{\text{C.E.M.} \times V_1 \times A} \cdot 1\,000$$

în care :

$316{,}8 \times 4$ = concentraţia soluţiei etalon ;
E_p = extincţia probei ;
V = volumul de hexan folosit la extragere, în ml ;
V_1 = volumul de hexan luat în lucru, în ml ;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml ;
100, 1 000 = transformarea g/litru în mg/100 ml, respectiv mg/1 000 ml ;

$$\text{C.E.M.} = \text{coeficient de extincţie molară} = \frac{E_s \times 10^5}{2}$$

dacă E_s = extincţia standard = 0,500, C.E.M. = 25 000.

Scanned with OKEN Scanner

Coeficientul de extincție molară se verifică la fiecare dozare, luînd 1 ml soluție standard + 19 ml reactiv fosfoceric și citind extincția E_s · C.E.M. (măsurați în cuvă de 1 cm) sînt apropiați de valoarea 25 000 pentru majoritatea antidepresivelor triciclice din această categorie.

Exemplu de calcul:

Sînge: Ep = 0,250, V = 20 ml, V_1 = 16 ml, A = 5 ml, C.E.M. = 25 000;

$$\text{mg imipramină/100 ml sînge} = \frac{316{,}8 \times 4 \times 0{,}250 \times 20}{25\,000 \times 16 \times 5} \cdot 100 = 0{,}317$$

Urină: Ep = 0,250, V = 50 ml, V_1 = 10 ml, A = 100 ml, C.E.M. = 25 000; (determinare în absența fenotiazinelor; fără diluare);

$$\text{mg imipramină/1 000 ml urină} = \frac{316{,}8 \times 4 \times 0{,}250 \times 50}{25\,000 \times 10 \times 100} \cdot 1\,000 = 0{,}63$$

Interpretarea rezultatelor

1. În tratamente cu o doză unică, orală, de 75 mg imipramină și în tratamente prelungite cu doze zilnice de 150 mg/zi, concentrațiile sanguine au fost de ordinul microgramelor/100 ml sînge. 2. În intoxicații cu doze masive de imipramină, concentrațiile sanguine au fost de 100—300 micrograme/100 ml în primele ore, de 50—200 micrograme/100 în următoarele zile, iar la persistența valorii de peste 150 micrograme/100 ml, prognosticul este defavorabil. În cazuri de decese, s-au găsit concentrații sanguine de 280—700 micrograme/100 ml (în medie 530 micrograme/100 ml), iar în ficat, 80—250 mg/kg (în medie 170 mg/kg). 3. Concentrațiile urinare de imipramină de diureză și se înscriu între 10 și 80 mg/litru.

Dibenzazepin (tip Opipramol)

A. **Izolare**

Izolarea se realizează ca la dihidrodibenzazepine.

B. **Identificare**

1. *Fluorescență*

La 10—15 ml extract organic se adaugă 3 ml reactiv fosfoceric și se agită puternic timp de un minut. Se observă, în faza inferioară acidă o colorație galbenă-verzuie (la concentrații mari) și o fluorescență intensă verde în lumina u.v. (max. de emisie, 522 nm). Aceeași fluorescență este observată și la adaus de reactiv Bourdon-Nicaise.

2. *Reacții de culoare*

(v. tabelul 27).

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acetonă și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu un martor.

Sistemul de migrare este benzen : metanol (5:6).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu acid fosforic d = 1,71 sau cu reactiv fosfoceric; în ambele cazuri se observă o fluorescență verde-galbenă la 366 nm.

Scanned with OKEN Scanner

4. *Spectrofotometrie în U.V.* (v. tabelul 28).

Dibenzcicloheptadine (tip Amitriptilină) și Doxepina

A. **Izolare**

Izolarea se realizează ca la dihidrodibenzazepine.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare și fluorescență*

a) *Reacția cu acid sulfuric și formaldehidă :* peste reziduul provenit din evaporarea extractului organic, se aduc 3 ml acid sulfuric concentrat, cînd apare, în prezența dibenzcicloheptadienelor, o coloraţie vișinie (pentru urină) și roșie (pentru lichide gastrice). Se transvazează soluția sulfurică într-o eprubetă, se adaugă 1 ml formol 35% și se observă la 320 nm o fluorescență galbenă-portocalie (max. emisie 560 nm pentru amitriptilină și 586 pentru nortriptilină). Dacă se diluează soluția sulfurică cu apă distilată se observă la 360 nm o fluorescență verde pentru produsul intact (medicament ca atare sau lichide gastrice) și albastră pentru metaboliți (urină, sînge). Doxepina dezvoltă, la adaus de acid sulfuric, o coloraţie roșie-portocalie, la adaus de formol, o fluorescență galbenă în U.V. (max. emisie 585 nm), iar la diluare cu apă, o fluorescență albastră.

b) *Alte reacții de culoare* (v. tabelul 27).

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml metanol și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sînt : ciclohexan ; benzen ; dietilamină(7,5:1,5:1) ; metanol ; amoniac 12 N (100:2) ; benzen ; metanol (5:6).

Revelarea se realizează prin : pulverizare cu reactiv Dragendorf modificat, reactiv Mandelin, reactiv F.P.N.

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*
(v. tabelul 28)

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică în U.V.*

Principiu

Amitriptilina și compușii înrudiți cu $-C=R_1$ se oxidează cu permanganat de potasiu la *p*H alcalin, rezultînd un derivat carbonilic care prezintă absorbție în U.V. la 250 nm, mai intensă decît a produsului neoxidat.

Reactivi

1. Tampon fosfat *p*H 7,5. Se amestecă 30 ml soluție hidroxid de sodiu 0,1 N cu 50 ml soluție fosfat monopotasic 0,1 M. 2. Hexan. 3. Acid clorhidric 0,5 N. 4. Permanganat de potasiu 1% în tampon fosfat *p*H 12,4 (pentru prepararea tamponului se amestecă volume egale de soluție de fosfat trisodic 15,2 g % și soluție de hidroxid de sodiu 1,6 g %). 5. Soluție standard stoc de amitriptilină. Se cîntăresc 0,0800 g amitriptilină și se aduc cu apă la 100 ml (1 ml = 0,8 mg). 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1:100 (1 ml = 8 micrograme amitriptilină).

Modul de lucru

Într-o pîlnie de separare se iau 5 ml produs de analizat (urină, sînge, lichide gastrice, omogenat de organe) și se aduc la *p*H 7—7,5 cu soluție tampon fosfat. Se extrag cu 100 ml hexan, agitînd timp de 5 minute. Se trece faza organică în altă pîlnie de separare, se adaugă 5 ml acid clorhidric 0,5 N și se agită 5 minute. Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu agitator magnetic se iau 4 ml fază acidă, se adaugă 20 ml permanganat de potasiu și 50 ml hexan. Se încălzește pe baia de apă la refrigerent ascendent timp de 30 minute. Se răcește, se separă faza hexanică, se spală cu 5 ml acid clorhidric 0,5 N. Se măsoară extincția Ep la spectrofotometru la λ = 250 nm. În condiții identice se prelucrează un etalon de concentrație 4 micrograme/5 ml apă (0,5 ml soluție standard diluată) și se citește extincția Es.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg amitriptilină la 100 ml produs biologic :

$$\text{mg amitriptilină/100 ml produs biologic} = 0{,}08\frac{Ep}{Es}$$

în care :

Ep și Es = extincția probei, respectiv a standardului.

Interpretarea rezultatelor

1. În tratamente cu o doză unică, orală, de 50 mg amitriptilină și în tratamente prelungite cu doze zilnice de 150 mg, concentrațiile sanguine au fost de ordinul microgramelor/100 ml sînge. 2. În intoxicații cu doze masive de amitriptilină, concentrațiile sanguine au fost de ordinul sutelor de micrograme/100 ml sînge. În cazuri de decese, s-au găsit : concentrații sanguine de 270—470 micrograme/100 (în medie 370 micrograme/100), în ficat, 13—317 mg/kg (în medie, 130 mg/kg), iar în urină, 0,4—7,9mg/litru (în medie 3,4 mg/litru). După unii autori, concentrațiile de amitriptilină și nortriptilină (principalul său metabolit) care depășesc 50 mg/kg indică o intoxicație acută, în timp ce concentrații sub această valoare, pledează pentru doze terapeutice.

II.6.15. AMFETAMINELE PSIHOTONICE

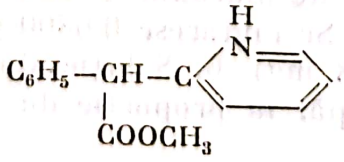
Principalele amfetamine psihotonice sînt :

— *Amfetamina*, $C_6H_5—CH_2—CH(CH_3)—NH_2$, racemică (sulfat : Benzedin, Psycholon, Ortedrin, Phenedin) și dextrogiră (sulfat : Dexamfetamină, Dexedrin) ;

— *Metamfetamina*, $C_6H_5—CH_2—CH(CH_3)—NHCH_3$, racemică și dextrogiră (clorhidrat : Pervitin, Methedrin, Desoxyn, Tonedron) ;

— *Mefentermina*, $C_6H_5—CH_2—C(CH_3)_2—NHCH_3$ (sulfat : Wyamin) ;

— *Metilfenidat* (Centedrin, Ritalin, Meridilum) :



Scanned with OKEN Scanner

A. **Izolare**

Amfetaminele se izolează din mediu alcalin cu solvenţi organici. Amfetamina fiind volatilă, poate fi izolată şi prin antrenare cu vapori de apă din soluţii alcalinizate, urmată sau nu, de extragere cu solvenţi. Înainte de îndepărtarea solventului, se salifică amfetamina, pentru a evita pierderea prin volatilizare. Izolarea se face de preferinţă din urină.

a) *Izolare direct din urină şi lichide gastrice :* se alcalinizează 20 ml urină (lichide gastrice) cu hidroxid de sodiu 10% la *p*H 10 şi se extrag cu 100 ml eter etilic (cloroform-eter, 3 ; 1), dicloretan, n-hexan. Extractul organic este filtrat printr-un filtru plisat, într-o capsulă. Se adaugă 0,25 ml acid sulfuric N pentru transformarea amfetaminei în sulfat, apoi se evaporă la sec pe baia de apă uşor încălzită (sub 60°C) sau, preferabil, se concentrează pînă la un mililitru.

b) *Izolare din urină prin antrenare cu vapori de apă :* se alcalinizează 50 ml urină cu hidroxid de sodiu 10% la *p*H 10 şi se supun antrenării cu vapori de apă, culegînd distilatul în 2 ml acid clorhidric 0,1 N. Distilatul este adus cu hidroxid de sodiu la *p*H 10 şi extras cu solvenţi ca în metoda precedentă, apoi salifiat şi evaporat la sec sau numai concentrat. Distilatul poate servi, de asemenea, pentru determinări, ca atare (neextras cu solvenţi).

c) *Izolare din sînge :* se alcalinizează 10 ml sînge cu hidroxid de sodiu 10% la *p*H şi se continuă ca la urină (pct. a).

d) *Izolare din corpuri delicte (medicamente) :* se cîntăreşte corpul delict şi se majorează cu 1—2 g clorură de bariu solidă şi 1 ml acid clorhidric 0,1 N. Se reia cantiativ amestecul cu 25 ml alcool absolut, aducîndu-se într-un balon Erlenmeyer. Se menţine balonul pe baia de apă la 50—60°C cîteva minute, se filtrează, se spală depozitul şi filtrul cu puţin alcool absolut. Se adaugă la filtrat 1 ml acid clorhidric 0,1 N şi se evaporă pe baia de apă la 50—60°C. Se dizolvă reziduul în 5 ml hidroxid de sodiu 0,1 N şi se filtrează. Filtratul se extrage de două ori cu cîte 20 ml cloroform. Extractele cloroformice reunite sînt tratate cu cîteva picături de acid clorhidric N şi evaporate la sec pe baia de apă la 50—60°C.

B. **Identificare**

1. *Teste orientative*

Se dizolvă reziduul în 2 ml apă, se pipetează cîteva picături pe patru sticle de ceas şi se adaugă cîte o picătură de :

— acid cloroplatinic 5% ; apar cristale gălbui, care se compară la microscop cu cristale martor ;

— reactiv Marquis : apare un precipitat roşu-cărămiziu, a cărui culoare trece succesiv în brun şi verde-oliv ;

— reactiv Meyer : se formează un precipitat alb ;

— reactiv Dragendorff : apare un precipitat portocaliu.

Aceste reacţii sînt utile numai pentru concentraţii mari de amfetamină — de exemplu, în identificarea corpului delict (medicament).

Scanned with OKEN Scanner

2. *Reacții de culoare*

a) *Reacții de condensare :* 1) Reziduul se reia cu 1 ml acetilacetonă, cînd se formează prin condensare, N-alchil-3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidină, colorată în galben-portocaliu. Reacția trebuie să aibă loc în mediu strict anhidru. 2) Reziduul se tratează cu 1 ml 2,5-hexandionă și se încălzește, cînd se formează prin condensare, 2,5-dimetil-1-(fenil-2-propil)-pirol, care tratat cu 1 ml p. dimetilaminobenzaldehidă 1% în alcool dezvoltă o culoare roșie. Sensibilitatea reacției este de 1 microgram/ml.

b) *Reacția Marquis :* concentratul lichid obținut la izolarea din urină este spotat pe o hîrtie de filtru impregnată cu citrat de sodiu, uscată și apoi tratată cu reactiv Marquis. Se dezvoltă o culoare portocalie virînd în brun.

c) *Reacția de diazotare :* reziduul dizolvat în puțină apă dă în mediu alcalin, cu p. nitroanilina diazotată sau cu acidul sulfanilic diazotat, azoderivați de culoare roșie. Reacția se pretează și la dozare.

d) *Reacția Pesez (tehnica Meunier) pentru amine secundare :* peste reziduul (sau concentratul lichid) se adaugă 2 ml soluție de acetaldehidă și se agită. Se menține 10 minute la întuneric, apoi se adaugă 0,25 ml soluție de cloranil și se agită. În prezența aminelor alifatice secundare (sau a arilalchilaminelor secundare) apare, în timp de 30 minute, o colorație verde-albastră sau albastră, proporțională cu concentrația substanței. Aminele primare dau această reacție, dar sînt mult mai puțin sensibile.

Soluția de acetaldehidă : se dizolvă 2 ml acetaldehidă proaspăt distilată în 100 ml dicloretan.

Soluția de cloranil (tetraclor-2,3,5,6-parabenzochinonă-1/4) 0,001 M în dicloretan (masa moleculară = 246 g).

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml cloroform (sau se folosește concentratul lichid) și se spotează pe cromatoplacă, în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sînt : etanol de 90° ; cloroform : metanol (1:1) ; acetonă : amoniac (99:1) ; acetat de etil : metanol : amoniac (8,5:1:0,5).

Relevarea se realizează prin pulverizare cu : verde de bromcrezol, iodoplatinat ; pentru amfetaminele cu NH_2 liber, se practică reacția de diazotare, pulverizîndu-se o soluție de paranitroanilină 1% în acid clorhidric 2 N, apoi o soluție de azotit de sodiu 25% și, după un minut, o soluție de carbonat de sodiu 10% pînă la alcalinizare, cînd apare colorația imediat.

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. sînt prezentate în tabelul 29.

Este de menționat că în ambele metode de izolare din urină — cu sau fără antrenare cu vapori de apă — se extrage, concomitent cu amfetamină și nicotina din urina fumătorilor. Nicotina, avînd un maxim de absorbție în U.V. la 257 nm, interferă în identificarea pe această cale, a amfetaminei.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 29

Valorile absorbțiilor maxime în U.V. și I.R. ale unor amfetamine (după Clarke)

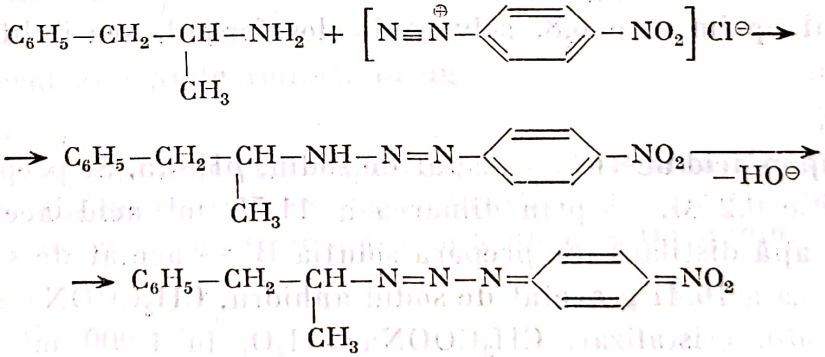
Amfetamina	*U.V. (maxime)*		*I.R. (în KBr)*		
	Apă	*H_2SO_4 0,1 N*	*A*	*B*	*C*
Amfetamina racemică (bază)		251, 257, 263	695	737 (în film lichid)	1 452
Amfetamina racemică (sulfat)		252, 257, 265			
Amfetamina dextr. (sulfat)			1 118	1 495	1 582
Metamfetamina (bază)		251, 257, 263			
Metamfetamina (clorhidrică)	251, 257, 263		747	698	1 475
Mefentermina		247, 252, 258, 264	1 111	711	696, 1 394
Metilfenidat		246, 251, 257, 263	1 728	1 165, 1 431	1 140, 1 200

C. Dozare

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Amfetamina, în mediu alcalin, se cuplează cu p. nitroanilina diazotată, rezultînd un azoderivat de culoare roșie, colorimetrabil:



Reactivi

1. P. nitroanilină diazotată: se tratează 2 ml p. nitroanilină 0,01 M în acid clorhidric 0,01 N cu soluție de nitrit de sodiu, picătură cu picătură, pînă la decolorare (se prepară extemporaneu). 2. Hidroxid de sodiu 10%. 3. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g amfetamină sulfat și se aduc cu apă la 50 ml. (1 ml = 2 mg). 4. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă, în proporție de 1:100 (1 ml = 20 micrograme).

Modul de lucru

Se dizolvă reziduul în apă și se aduce cantitativ într-un balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluție și se tratează cu 1 ml reactiv

p. nitroanilină diazotată și 0,5 ml hidroxid de sodiu 10%. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 530$ nm, în cuva de 1 cm, față de apă distilată.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 100 micrograme/5 ml (0,5—5 ml soluție standard de lucru, completat la 5 ml cu apă distilată). Valoarea extincției pentru probă se înmulțește cu 4 (deoarece s-a lucrat cu 1/4 din probă) obținîndu-se concentrația C a amfetaminei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg amfetamină 100 ml sînge sau mg/1 000 ml urină :

$$\text{mg amfetamină/100 ml sînge} = \frac{C}{A \cdot 10}$$

$$\text{mg amfetamină/1 000 ml urină} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația amfetaminei, în μg ;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică rapidă (tehnica Kincses-Aytay și colab.)*

Principiu

Amfetamina formează cu coloranții acizi de tipul tropeolină 00 și albastru de bromtimol, complecși liposolubili, extractibili în solvenți organici. În cazul tropeolinei, *p*H-ul optim este 4,5, solventul adecvat este cloroformul, sensibilitatea 2 μg/ml amfetamină, iar în cazul albastrului de bromtimol, *p*H-ul optim este 6,8, solventul, cloroformul, sensibilitatea 1 μg/ml amfetamină.

Reactivi

1. Tampon acid acetic — acetat de sodiu, *p*H 4,5. Se prepară soluția A — acid acetic 0,2 M, — prin diluarea a 11,55 ml acid acetic glacial la 1 000 ml cu apă distilată. Se prepară soluția B — acetat de sodiu 0,2 M — prin dizolvarea a 16,41 g acetat de sodiu anhidru, CH_3COONa sau a 27,22 g acetat de sodiu cristalizat, $CH_3COONa \cdot 3\,H_2O$, în 1 000 ml apă distilată. Pentru prepararea tamponului *p*H 4,5, se amestecă 28 ml soluție A cu 22 ml soluție B. 2. Tropeolină 00 (4-fenilaminoazobenzen, 4-sulfonat de sodiu), soluție apoasă 1%. 3. Cloroform p.a. 4. Acid sulfuric, soluție 1% în metanol. 5. Acetat de sodiu, soluție 2 M, *p*H 6,8. Se dizolvă 16,41 g acetat de sodiu anhidru, CH_3COONa sau 27,22 g acetat de sodiu cristalizat, $CH_3COONa \cdot 3\,H_2O$ în 100 ml apă distilată. 6. Albastru de bromtimol, soluție apoasă 0,1%. 7. Hidroxid de sodiu, soluție 0,4% în metanol. 8. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g amfetamină sulfat și se aduc cu apă la 50 ml (1 ml = 2 mg). 9. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc în proporție de 1:20 (1 ml = 100 μg).

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

1) Într-o pîlnie de separare se iau : 2 ml urină, 3 ml tampon acid acetic — acetat de sodiu, 3 ml soluție tropeolină. Se agită și se extrag de două ori cu cîte 5 ml cloroform. Se separă fazele cloroformice, din care se iau 8 ml și se adaugă 2 ml acid sulfuric 1% în metanol. Se dezvoltă o culoare roșie. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 520$, în cuva de 1 cm, față de un martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg/2 ml (0,2—1,0 ml soluție standard de lucru, completat la 2 ml cu urină martor). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 1,25 (deoarece s-a lucrat cu 4/5 din probă) obținîndu-se concentrația C a amfetaminei în μg, în probă.

2) Într-o pîlnie de separare se iau : 2 ml urină, 3 ml acetat de sodiu 2 M, 3 ml reactiv albastru de bromtimol. Se agită și se extrage de două ori cu cîte 5 ml cloroform. Se separă fazele cloroformice și se alcalinizează cu 2 ml hidroxid de sodiu 0,4% în metanol. Se dezvoltă o culoare albastră. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 590$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg/2 ml (0,1—0,5 ml soluție standard de lucru, completat la 2 ml cu urină martor). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a amfetaminei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg amfetamină/1 000 ml urină :

$$\text{mg amfetamină/1 000 ml urină} = \frac{C}{2}$$

în care :

C = concentrația amfetaminei, în μg.

Observații

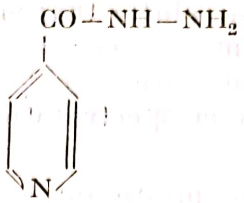
Metoda spectrofotometrică rapidă, prezintă avantajele de a permite dozarea direct din urină (fără extragere prealabilă), de a fi sensibilă, reproductibilă, ușor de executat și de a necesita un consum minim de reactivi și solvenți.

Interpretarea rezultatelor

1. După o doză unică orală de 10 mg d. amfetamină sulfat, concentrațiile sanguine ating maximum 3,5 micrograme/100 ml sînge — după — aproximativ 2 ore. 2. La un amfetaminoman care consumă zilnic 1 000 mg amfetamină, s-au găsit concentrații sanguine de 200—300 micrograme/100 ml sînge. În cazuri de decese, s-au găsit : concentrații sanguine de 50—4100 micrograme/100 (în medie, 860 micrograme/100), în ficat, 4—74 mg/kg (în medie, 30 mg/kg), iar în urină, 25—700 mg/litru (în medie 240 mg/litru). 3. Eliminarea amfetaminei este în funcție de *p*H-ul urinar : în urina acidifiată aproximativ 60% dintr-o doză de d. amfetamină se elimină ca atare, nemetabolizată, în interval de 48 ore, pe cînd în urina alcalină, procentul de amfetamină nemetabolizată este de numai 5—7%.

Scanned with OKEN Scanner

II.6.16. IZONIAZIDA



A. Izolare

Izoniazida (hidrazida izonicotinică, HIN) se izolează din mediu alcalin, cu solvenți organici.

a) *Izolare din urină :* se deproteinizează 15 ml urină cu 5 ml acid tricloracetic 10%, se încălzesc 10 minute pe baia de apă, se filtrează și se aduce filtratul incolor, cantitativ, cu apă, la 25 ml. Se extrage de două ori cu câte 25 ml eter. Dacă filtratul este galben, se alcalinizează cu NaOH 10%, apoi se extrage de două ori cu câte 25 ml eter. Extractele eterice reunite se evaporă la sec pe baia de apă. Se dizolvă reziduul în 10 ml apă distilată și se aduce cantitativ la 25 ml.

b) *Izolare din sînge :* se deproteinizează 5 ml sînge cu 5 ml acid tricloracetic 10, se agită, se încălzesc 10 minute pe baia de apă, se filtrează și se aduce filtratul, cantitativ, cu apă, la 25 ml, apoi se poate extrage cu eter ca la urină sau se utilizează ca atare.

Determinarea HIN în plasmă se poate face direct, fără o prelucrare prealabilă.

B. Identificare

1. *Reacții de culoare*

a) *Reacții cu aldehide :* la 2 ml filtrat se adaugă 2—3 picături de soluție alcoolică de vanilină 2%, cînd apare o coloratie galbenă. La 2 ml filtrat se adaugă 0,3—0,5 ml acid acetic 1% și 1 ml soluție alcoolică de p. dimetilaminobenzaldehidă, cînd apare o coloratie galbenă-portocalie. Ambele reacții se pretează pentru dozare.

b) *Reacția de formare a albastrului de molibden :* la 1 ml filtrat se adaugă 0,5 ml soluție alcoolică de reactiv fosfomolibdenic 1%, cînd, imediat sau după alcalinizare cu amoniac, apare o coloratie albastră.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml apă și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este amoniac concentrat : metanol (1,5:100).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu iodoplatinat acidulat (se dizolvă 0,25 g clorură de platină și 5 g KI în 100 ml apă și se adaugă 2 ml acid clorhidric concentrat).

3. *Spectrofotometria în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime).*

Izoniazidă în apă, 266 ; în HCl 0,01 N, 265 (în raport cu *p*H-ul se poate diferenția HIN de acetilizoniazida, principalul său metabolit).

b) *I.R. (în KBr).*

Izoniazida A (1659), B (1552), C (1335, 1628).

Scanned with OKEN Scanner

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (tehnica Deeb și Vitagliano modificată de Meunier)*

Principiu

Izoniazida, datorită grupării sale hidrazinice (cu gruparea NH_2 liberă) se poate condensa cu aldehide și cetone. Astfel, cu 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehida, $CH_3O-C_6H_3(OH)-OCH_3$ (vanilina), se formează un compus galben, colorimetrabil, a cărui coloraţie se intensifică prin alcalinizarea soluției.

Reactivi

1. Soluție de vanilină. La 2 g vanilină se adaugă 25 ml alcool de 95° și se completează la 100 ml cu apă. 2. Acid tricloracetic 20%. 3. Acid sulfuric 1 N. 4. Hidroxid de sodiu 40%. 5. Soluție standard stoc. Se cântăresc 0,0500 g izoniazidă și se aduc cu apă la 250 ml (1 ml = 200 μg). 6. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă în proporție de 1:10 (1 ml = 20 μg).

Modul de lucru

În trei eprubete de centrifugă se pipetează următorii reactivi (se folosește plasmă — sînge recoltat pe oxalat — sau ser):

Eprubeta de centrifugă/reactivii	1	2	3
Plasmă (ser) (ml)	0	2	2
Soluție standard de lucru (ml)	0	0	2
Apă distilată (ml)	6	4	2
Acid tricloracetic 20 % (ml)	4	4	4

Se agită, se centrifughează la 3 000 rot/min. timp de 10 minute. În trei tuburi de hemoliză se pipetează:

Tubul de hemoliză/reactivii	1	2	3
Supernatant din eprubeta de centrifugă corespunzătoare (ml)	4	4	4
Soluție de vanilină (ml)	0,5	0,5	0,5
Acid sulfuric 1 N	0,5	0,5	0,5

Se agită, se menţin timp de 10 minute la întuneric și se adaugă cîte 0,6 ml hidroxid de sodiu 40%. Se citește extincția probelor din eprubetele 2 (E_2) și 3 (E_3), la spectrofotometru, la $\lambda = 400$ nm, în cuva de 1 cm, față de proba oarbă a reactivilor din eprubeta 1 (E_1).

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg HIN la 100 ml plasmă (ser):

$$\text{mg HIN/100 ml plasmă (ser)} = 2\,\frac{E_2}{E_3 - E_2}$$

Scanned with OKEN Scanner

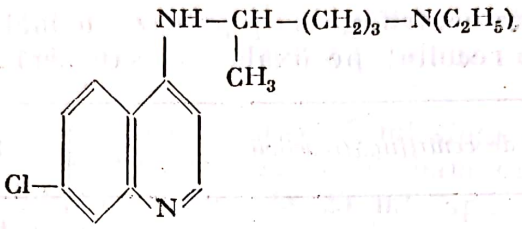
Observație

Acidul p. aminosalicilic (PAS) sulfamidele, fenelzina, dau aceeași reacție de condensare cu funcția aldehidică a vanilinei ; de altfel această metodă servește și la dozarea PAS în lichidele biologice.

Interpretarea rezultatelor

1. În tratamente cu o doză unică orală de 350 mg HIN s-au decelat concentrații sanguine de ordinul sutelor de micrograme/100 ml. 2. La ingerare de doze masive (de exemplu 2 g HIN) concentrațiile maxime au fost de 2—14 mg/100 ml și concentrațiile urinare de 400—1 400 mg/litru. În cazuri mortale prin ingerarea de 10—15 g HIN, concentrațiile sanguine au fost de 7—17 mg/100 ml.

II.6.17. CLOROCHINA



A. Izolare

Clorochina se izolează din mediu alcalin cu solvenți organici.

a) *Izolare din sînge :* se iau, într-un tub de centrifugă, 5 ml sînge total recoltat pe heparină (clorochina se fixează într-un procent însemnat pe hematii)și 10 ml apă distilată și se agită pentru a provoca hemoliza. Se adaugă 5 ml hidroxid de potasiu 60% și se menține 3 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește și se extrage de trei ori cu cîte 20 ml eter. Extractele eterice reunite sînt spălate cu 20 ml hidroxid de sodiu 0,01 N, apoi deshidratate prin agitare cu sulfat de sodiu anhidru. Se filtrează și se evaporă la sec filtratul.

b) *Izolare din urină :* se alcalinizează 50 ml urină cu 5 ml hidroxid de potasiu 60% și se extrag de două ori cu cîte 50 ml eter. Extractele eterice reunite sînt spălate cu 50 ml hidroxid de sodiu 0,01 N, apoi deshidratate prin agitare cu sulfat de sodiu anhidru. Se filtrează și se evaporă la sec filtratul.

B. Identificare

1. *Reacții de culoare*

a) *Reacția cu molibdat de sodiu și tiocianat de potasiu* : se dizolvă reziduul în 1 ml acid sulfuric 1% și se tratează cu 1 ml molibdat de sodiu 5%. Se separă precipitatul și se dizolvă în 1 ml hidroxid de sodiu 1%. Se adaugă 3 ml apă distilată, 1 ml acid sulfuric 10% și 2 ml reactiv acid sulfuric-clorură stanoasă-tiocianat, cînd apare o coloratie portocalie, extractibilă în alcool amilic. Reacția se bazează pe acțiunea reducătoare a $SnCl_2$ asupra molibdatului, care trece în ion molibdic și reacționează cu SCN^-.

Reactiv acid sulfuric-clorură stanoasă-tiocianat : se amestecă, în momentul întrebuințării, 5 volume soluție A (45 ml H_2SO_4 concentrat, 10 ml

HCl concentrat și 13 ml apă), 3 volume soluție B (5 g $SnCl_2$, 4 ml HCl concentrat și 16 ml apă) și 1,5 volume soluție C (KSCN 20%).

b) *Diferențierea clorochinei de primachină :* se dizolvă reziduul în cîțiva mililitri apă acidulată și se tratează cu 1 ml sulfat de ceriu și amoniu 5% în acid azotic 10%, cînd primachina, spre deosebire de clorochină, dezvoltă o coloratie intens violetă.

2. *Fluorescență*

Se reia reziduul cu 1 ml apă distilată și se adaugă o picătură de acid sulfuric 1 N, cînd se observă o fluorescență verde-albastră puțin intensă, care se intensifică după alcalinizarea soluției la *p*H 9,5—10 (λ maxim de emisie = 396 nm).

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml apă acidulată și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este acetonă : apă ; amoniac concentrat (90:30:1).

Revelarea se realizează prin : expunere în lumina U.V. (fluorescență verde -albastră (366 nm) ; pulverizare cu iodoplatinat.

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

Clorochina bază în H_2SO_4 0,1 N : 221, 236, 257, 329 ; HCl 0,01 N : 343.

Clorochina fosfat în HCl 0,01 N : 257, 329, 343.

b) *I.R. (în KBr)*

Clorochina bază : A (1573), B (1538), C(1372, 1448).

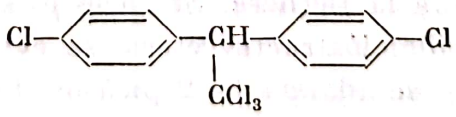
C. **Determinări biochimice**

1. *Dozarea methemoglobinei* (v. Aminele aromatice)
2. *Identificarea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (G-6-PDH)* (v. Aminele aromatice)

Serierea executării analizelor toxicologice de urgență — privind în special medicamentele — este prezentată, după Meunier, în *anexa 3.*

II.7. DETERMINAREA UNOR PESTICIDE

II.7.1. DICLORDIFENILTRICLORETANUL (DDT)



A. **Izolare**

Diclordifeniltricloretan (DDT) se izolează din mediu acid cu solvenți organici.

a) *Izolare din produse alimentare (corpuri delicte) :* produsul solid bine fragmentat, sau produsul semisolid concentrat pe baia de apă pînă la pier-

derea unei mari părți din cantitatea de apă, sau produsul lichid ca atare, se acidulează cu acid sulfuric 10%, se trece într-un borcan cu dop rodat sau într-o pîlnie de separare și se extrage, de două ori, prin agitare puternică, cu un volum egal sau dublu de eter etilic sau eter de petrol. Fazele de solvent se decantează, se reunesc și se filtrează pe un filtru uscat, într-o capsulă, apoi se evaporă la sec la 50—60°. Extragerea se poate realiza pentru produse uscate, ușor de omogenizat (făină, cereale) — într-un aparat Sohlet (25 g produs extras în eter, benzen sau hexan, timp de 2—4 ore).

b) *Izolare din țesuturi grase* : se triturează 5—10 g țesut gras cu puțin nisip purificat. Se adaugă 10—20 g sulfat de sodiu anhidru și se trece amestecul, cantitativ, într-un flacon Erlenmeyer cu dop rodat, cu 50 ml eter etilic. Se sulfonează grăsimile cu 5 ml amestec de 2 părți acid sulfuric concentrat și 1 parte acid sulfuric cu 20% SO_3, proaspăt preparat și răcit la gheață. Se decantează faza de solvent, apoi se îndepărtează urmele de grăsimi prin trecere pe o coloană de adsorbție. Se utilizează, în acest scop, un tub de sticlă (lungimea de 20—25 cm, diametrul interior de 2,0—2,5 cm) îngustat la partea inferioară. La baza tubului se introduc : un strat de vată de sticlă, apoi 4 g Kieselgur purificat, și, în fine, 4 g oxid de aluminiu ; toate straturile se tasează bine cu o baghetă de sticlă. Se trec prin coloană, de 3—4 ori, cîte 20 ml tetraclorură de carbon. La partea superioară a coloanei se așază o pîlnie de sticlă cu puțin sulfat de sodiu anhidru (pentru a reține eventualele urme de apă), prin care se trece extractul sulfonat. Dacă nu se obține un lichid limpede, se repetă operația, folosind o altă coloană, identică. Lichidul limpede se colectează într-o capsulă și se evaporă la sec.

B. *Identificarea*

1. *Reacții de culoare*

a) *Reacția Beilstein :* reziduul (sau produsul de analizat) se introduce în flacăra oxidantă a unui bec cu gaz cu ajutorul unei sîrme de cupru cu buclă. Culoarea verde a flăcării indică prezența compușilor organoclorurați.

b) *Reacția Fujiwara :* peste reziduu se adaugă cîteva picături de piridină și o granulă de hidroxid de potasiu, cînd, în prezența DDT, apare o colorație roșie. În altă variantă, se încălzește reziduul pe baia de apă la 80°C cu două granule de hidroxid de potasiu și 2 ml soluție de xanthidrol 0,4% în piridină. Stratul piridinic se colorează în roșu intens în prezența DDT și a clordanului și în violet în prezența toxafenului.

c) *Reacția de nitrare :* reziduul se tratează cu 1 ml amestec nitrant (părți egale de acid azotic fumans și acid sulfuric concentrat) și se încălzește 15 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește, se diluează cu 5 ml apă și se extrage cu eter etilic. Extractul eteric se evaporă la sec, se reia reziduul în 1 ml acetonă și se adaugă 1—2 picături hidroxid de potasiu 10% în metanol sau de metoxid de sodiu 10% în metanol. Se dezvoltă o colorație albastru-închis. Reacția se pretează pentru dozare. În altă variantă, produsul de analizat se extrage cu cîțiva mililitri n. hexan. Peste faza hexanică se adaugă 2—3 picături de hidroxid de potasiu, soluție normală, alcoolică. Se evaporă solventul și se redizolvă reziduul în cîteva picături

tetraclorură de carbon, apoi se agită puternic cu amestec acid azotic concentrat și acid sulfuric concentrat (1:3). În prezența DDT apare o coloratie verde trecătoare, iar a DDT (în absența tetraclorurii de carbon), o coloratie roșie.

d) *Reacția cu hidrochinonă:* reziduul se tratează cu 2 ml hidrochinonă 0,5% în acid sulfuric, cînd apare o coloratie roșie.

2. *Cromatografie în strat subțire*

a) *Tehnica Borș și colab.*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml metanol și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori (soluții 0,1% conținînd substanțe de referință).

Sistemele de migrare sînt: petrosin (fracțiunea de distilare 150—180°C): acetonă (1:1) sau petrosin: butanonă (1:1).

Revelarea se realizează prin pulverizarea cu soluție 1% azotat de argint în acetonă, urmată de menținere la 105—115°. Examinarea și localizarea spoturilor se execută în lumina ultravioletă. Valorile Rf-urilor sînt: petrosin-acetonă (1:1), DDT pp', 0,52, Lindan, 0,85: petrosin: butanonă (1:1), DDT pp', 0,55, Lindan, 0,85. Sensibilitatea pentru DDT pp' este de 11 μg, iar pentru Lindan (izomerul γ HCH), 7 μg.

b) *Tehnica Stan și colab.*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acetonă și se spotează pe cromatoplacă, în paralel cu martori (soluții 0,1% în acetonă a substanțelor de referință).

Sistemele de migrare și Rf-urile sînt înscrise în tabelul 30.

Tabelul 30

Sistemele de migrare și Rf-urile unor insecticide organoclorurate

Sistemul de migrare	*Rf*				
	DDT	*HCH*	*Aldrin*	*Dieldrin*	*Endrin*
Petrosin 150—155°C	0,70	0,35	0,80	0,15	0,20
Heptan : xilol (3 : 1)	0,75	0,50	0,85	0,20	0,25
Heptan : xilol : pentan (3 : 1 : 1)	0,75	0,50	0,88	0,18	0,25
Heptan (normal)	0,50	0,22	0,75	0,05	0,10
Ciclohexan : pentan (1 : 1)	0,77	0,50	0,92	0,29	0,35
Ciclohexan : pentan (3 : 5)	0,60	0,20	0,80	0,05	0,20
Ciclohexan : xilol (5 : 3)	0,85	0,50	0,95	0,28	0,34
Ciclohexan : cloroform (5 : 1)	0,90	0,52	0,98	0,38	0,43
Ciclohexan : diclormetan (5 : 1)	0,75	0,40	0,87	0,20	0,25

Revelarea se realizează prin pulverizare cu reactivi cromogeni preparați astfel: la 10 ml sulfat de cupru 10% se adaugă trietanolamină pînă la dizolvarea precipitatului format, apoi se adaugă unul din următorii coloranți indicatori:

a) 4 ml rodamină B 0,10%; b) 4 ml rodamină B 0,10%; și 4 ml xilenoloranj 0,36%; c) 2 ml eriocromcianină R 0,5% și 1 ml xilenoloranj 0,36%; d) 2 ml eriocromcianină R 0,5%. Reactivii a) și b) dau spoturi roșu intens pe fond roșu-violet deschis, iar reactivii c) și d), spoturi albastre

Scanned with OKEN Scanner

verzui care trec în albastru, pe fond violet. Sensibilitatea este de 5—10 μg, iar rezultatele optime se obțin pentru concentrații de peste 20 μg.

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

DDT în H_2SO_4 0,1 N 236, 266, 276.

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (pentru aer)*

Principiu

Diclordifeniltricloretan (DDT) se nitrează la tetranitroderivați care, extrași cu metiletilcetonă, formează, în mediu alcalin, un compus colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 2,5 μg/ml.

Reactivi

1. Etanol ; 2. Amestec nitrant. Se amestecă, răcind sub robinet, 1 volum acid azotic fumans (d = 1,50) și 1 volum acid sulfuric d = 1,84. Se păstrează în sticle brune, maximum 2 săptămîni ; 3. Hidroxid de sodiu 40% ; 4. Metiletilcetonă ; 5. Hidroxid de potasiu 40% ; 6. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g DDT și se aduc la 100 ml cu etanol (1 ml = 1 mg) ; 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu etanol, în proporție de 1:10 (1 ml = 100 μg DDT).

Recoltarea probelor

Se aspiră 100 l aer cu un debit de 10—15 litri/minut printr-un dispozitiv filtrant cu vată de sticlă.

Modul de lucru

Materialul filtrant se trece într-un pahar Berzelius de 50 ml, se adaugă 10—15 ml etanol și se lasă 24 ore. Se transvazează într-un flacon Erlenmeyer de 50 ml, spălînd cantitativ cu etanol și se evaporă pe baia de apă la fierbere. Peste reziduu se adaugă 2 ml amestec nitrant, se introduce flaconul într-o baie de ulei la 110°C și se menține 45 minute pentru efectuarea nitrării și îndepărtarea vaporilor nitroși. Dacă aceștia nu au dispărut complet, se prelungește timpul de menținere pe baie încă 10—15 minute. Se adaugă 5 ml apă și se neutralizează cu hidroxid de sodiu 40% (la hîrtie de turnesol), răcind sub robinet. După ce s-a atins punctul de neutralizare, se adaugă încă o picătură de NaOH 40%. Se transvazează cantitativ soluția într-o pîlnie de separare de 100 ml, reluînd de trei ori cu cîte 5 ml apă. Se adaugă 10 ml metiletilcetonă și se agită un minut (soluția apoasă trebuie să aibă în timpul extragerii, temperatura de 30—35°C). După separarea fazelor, se îndepărtează faza apoasă, se trece faza organică într-o eprubetă gradată și se aduce la 10 ml cu metiletilcetonă. Se adaugă 1,5 ml hidroxid de potasiu 40%, agitînd puternic 30—40 secunde. Se citește extincția la spectrofotometru, la λ = 540 nm, în cuva de 2 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 25 și 150 μg DDT (se iau 0,25—1,5 ml soluție standard de lucru, se completează la 1,5 ml cu etanol și se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a DDT, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DDT la m^3 aer:

$$\text{mg DDT/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

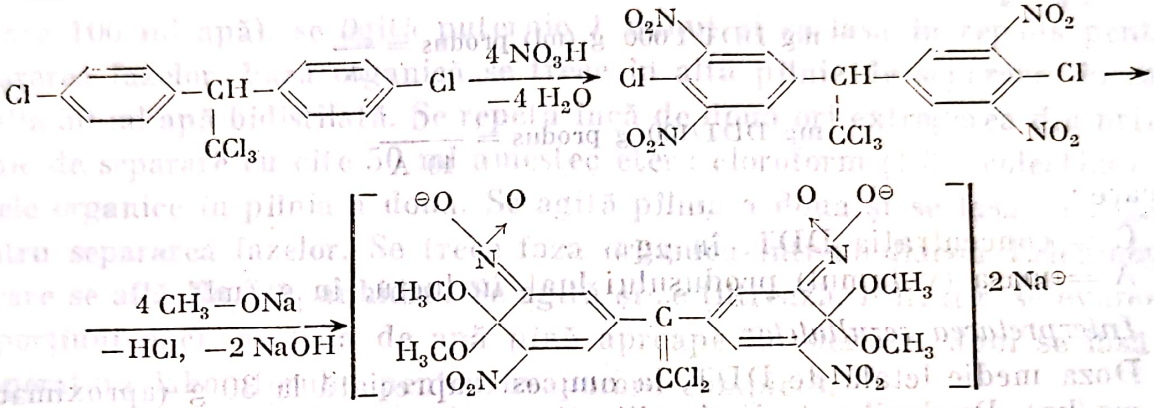
în care:

C = concentrația DDT, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

2. *Metoda spectrofotometrică (pentru produse alimentare, corpuri delicte, țesuturi grase etc.)*

Principiu

Diclordifeniltricloretanul (DDT) se nitrează la tetranitroderivați, care, cu metoxid de sodiu în mediu de benzen, formează un compus albastru închis, colorimetrabil:



Reactivi

1. Metanol. 2. Amestec nitrant (v. metoda precedentă). 3. Eter. 4. Hidroxid de potasiu 5%. 5. Clorură de sodiu, soluție saturată. 6. Sulfat de sodiu anhidru. 7. Benzen. 8. KOH 10% în metanol (sau metoxid de sodiu 2,6 N în metanol absolut). 9. Soluție standard. Se cîntăresc 0,1000 g DDT și se aduc la 100 ml cu metanol (1 ml = 1 mg DDT). 10. Soluție standard de lucru. Se diluează soluție standard stoc, cu metanol, în proporție de 1:10 (1 ml = 100 μg DDT).

Modul de lucru

Reziduul rezultat de la extragerea cu solvenți organici, se dizolvă în metanol, se trece cantitativ într-un flacon Erlenmeyer și se evaporă la sec pe baia de apă. Se adaugă, cu atenție, 5 ml amestec nitrat, pe o baie cu gheață. Se omogenizează cu o baghetă de sticlă și se menține 30 minute la temperatura laboratorului, 15 minute pe baia de apă la fierbere, apoi se răcește pe baia cu gheață. Se aduce cantitativ conținutul flaconului, cu 10 ml apă, într-o pîlnie de separare. Se extrage, prin agitare puternică, cu 20 ml eter sau benzen. Se îndepărtează faza apoasă, iar faza organică se spală de 2 ori cu cîte 5 ml hidroxid de potasiu 5%, pentru eliminarea urmelor de acid. Dacă soluția de spălare este galbenă, se repetă spălarea, pînă la obținerea unei soluții incolore. Totuși, operația de spălare nu trebuie să depășească 2—3 minute, deoarece DDT ar putea fi descompus în contact cu soluția alcalină. Se îndepărtează urmele de KOH prin spălare cu 10—15 ml NaCl.

Se repetă spălarea, pînă cînd soluția de spălare nu mai are reacție alcalină la turnesol. Se filtrează extractul organic într-o capsulă, printr-un filtru care conține puțin Na_2SO_4 (urmele de apă împiedică reacția de culoare). Se evaporă la sec pe baia de apă. Se reia reziduul în 3 ml benzen și se adaugă 1 ml KOH 10% în metanol (sau 1 ml metoxid de sodiu 2,6 N în metanol absolut). Se citește extincția după 5 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 580$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 μg și 100 μg DDT (în 5 flacoane Erlenmeyer se iau 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 și 1,0 ml soluție standard, se evaporă la sec pe baia de apă și se prelucrează, în continuare, în paralel cu probele, începînd de la operația de nitrare). Valoarea extincției probei se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a DDT, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DDT la 1 000 g, 1 000 ml sau 100 g produs:

$$\text{mg DDT/1 000 g (ml) produs} = \frac{C}{A}$$

$$\text{mg DDT/100 g produs} = \frac{C}{10\ A}$$

în care:

C = concentrația DDT, în μg;

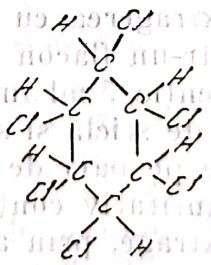
A = masa (volumul) produsului luat în lucru, în g (ml).

Interpretarea rezultatelor

Doza medie letală de DDT, la om, este apreciată la 30 g (aproximativ 400 mg/kg). Produșii petrolieri utilizați ca solvent măresc toxicitatea DDT, încît o doză de 150 mg/kg de DDT în petrol lampant este foarte toxică pentru om. Doze orale de 16—120 mg/kg au produs convulsii la persoanele intoxicate accidental.

Concentrațiile de DDT în țesutul adipos la persoanele neexpuse au fost între 1,7 și 28 mg/kg țesut adipos.

II.7.2. HEXACLORCICLOHEXAN (HCH)



A. **Izolare**

Hexaclorciclohexanul (HCH) se izolează din mediu acid sau alcalin cu solvenți organici.

a) *Izolare din produse biologice:* se extrag 50 g produs biologic sau 5 ml sînge, prin agitare puternică, într-o pîlnie de separare sau flacon Erlenmeyer

Scanned with OKEN Scanner

cu dop rodat, de două ori, cu cîte un volum dublu sau egal de eter de petrol. Extractele eterice reunite se filtrează pe un filtru uscat (conținînd sulfat de sodiu anhidru) într-o capsulă și se evaporă la sec. Hexaclorciclohexanul nu se cercetează în urină, deoarece nu se elimină pe cale renală.

b) *Izolare din apă.* 1) *În cazul concentrațiilor mici de HCH :* se adaugă, la 5—10 litri apă de analizat, 0,5—1,0 g cărbune activat și se agită 2 ore cu un agitator magnetic. Se lasă în repaus 2 ore, apoi se filtrează printr-o pîlnie Büchner. Se usucă filtrul la temperatura laboratorului, se împătureste și se introduce în cartușul unui aparat Soxhlet. Se extrage 2 ore cu amestec eter : cloroform (1:3). Se evaporă extractul organic pe baia de apă pînă aproape de sicitate, apoi se lasă la temperatura laboratorului pentru evaporare completă. 2) *În cazul concentrațiilor mari de HCH :* se introduc 200—500 ml apă într-o pîlnie de separare și se adaugă 50 ml amestec eter : cloroform (1:3). Se acidulează cu acid sulfuric concentrat (2 ml H_2SO_4 pentru fiecare 100 ml apă), se agită puternic 1 minut și se lasă în repaus pentru separarea fazelor. Faza organică se trece în altă pîlnie de separare, în care se află 50 ml apă bidistilată. Se repetă încă de două ori extragerea din prima pîlnie de separare cu cîte 50 ml amestec eter : cloroform (1:3), colectîndu-se fazele organice în pîlnia a doua. Se agită pîlnia a doua și se lasă în repaus pentru separarea fazelor. Se trece faza organică într-un flacon Erlenmeyer în care se află Na_2SO_4 anhidru. Se agită și se filtrează. Filtratul se evaporă, în porțiuni mici, pe baia de apă pînă aproape de sicitate, apoi se lasă la temperatura laboratorului pentru evaporare completă.

B. **Identificare**

1. *Reacții de declorinare*

a) *Reacția Busch (reducere cu hidrat de hidrazină în prezența paladiului) :* reziduul se tratează cu 3—4 ml etanol, 5 ml hidroxid de potasiu 2 N soluție alcoolică, 1 ml hidrat de hidrazină și puțin paladiu metalic. Se încălzește pe baia de apă la fierbere, cu refrigerent de reflux, 15 minute, se răcește, se acidulează cu acid azotic 5 N și se identifică ionul clor cu azotat de argint. Are loc declorinarea completă și, concomitent, hidrogenarea HCH de către hidratul de hidrazină în mediu alcalin și în prezența paladiului drept catalizator :

$$C_6H_6Cl_6 + 3\ (NH_2 - \overset{\oplus}{N}H_3 + OH^{\ominus}) + 6\ KOH \rightarrow C_6H_{12} + 6\ KCl + 3\ N_2 + 9\ H_2O$$

b) *Declorinarea parțială :* reziduul se tratează cu 10 ml KOH 10% în etanol și se fierbe pe baia de apă cu refrigerent de reflux 15 minute. Se răcește, se acidulează cu acid azotic 20% și se identifică ionul celor cu azotat de argint :

$$C_6H_6Cl_6 + 3\ KOH \rightarrow C_6H_3Cl_3 + 3\ KCl + 3\ H_2O$$

2. *Microcristalografie*

Izomerii HCH prezintă la microscop cristale de forme specifice. Se rezolvă reziduul în 1 ml eter de petrol, se plasează cîteva picături din soluția

eterică pe o lamă microscopică, se evaporă la temperatura laboratorului și se observă la microscop. Izomerul gama (lindan) se prezintă sub formă de cristale aciculare grupate sub diferite forme.

3. *Cromatografie în strat subțire* (v. Diclordifeniltricloretanul)

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (pentru aer, apă)*

Principiu

Hexaclorciclohexanul (HCH) eliberează clor, prin tratare cu hidroxid de sodiu, soluție alcoolică. Clorul reacționează cu sulfocianura de mercur, rezultînd sulfocian, care cu Fe^{3+} formează un compus roșu, colorimetrabil.

Reactivi

1. Toluen, proaspăt distilat. 2. Nitrat de sodiu, 45%. 3. Hidroxid de sodiu, soluție 0,1 N în etanol. Se amestecă 2 ml NaOH 5 N cu 98 ml etanol 96°. 4. Sulfat feriamoniacal 1% în acid azotic 15%. Se dizolvă la cald 1 g sulfat feriamoniacal în 15 ml acid azotic concentrat, se răcește și se completează la 100 ml cu apă. 5. Sulfocianură de mercur 0,1% în etanol. Se dizolvă 100 g mercur metalic în 140 g acid azotic concentrat (103 ml), se lasă să reacționeze pînă nu se mai degajă vapori bruni de oxizi de azot, se corectează *p*H-ul la 4—5 cu amoniac, apoi se adaugă 160 g sulfocianură de amoniu dizolvată în 200 ml apă. Se agită puternic, se filtrează și se spală precipitatul pînă la îndepărtarea totală a ionului azotat (se încearcă cu difenilamină). Se usucă ferit de lumină. 6. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,5000 g HCH și se aduc la 100 ml cu toluen (1 ml = 5 mg). 7. a) Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu toluen în proporție de 1:100 (1 ml = 50 μg HCH). 7. b) Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu toluen în proporție de 1:1000 1 ml = 5 μg HCH.

a) *Aer*

Recoltarea probelor

Se aspiră aer cu un debit de 10 litri/minut printr-un microimpinger conținînd 50 ml toluen.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul microimpingerului într-o pîlnie de separare, se adaugă 50 ml soluție azotat de sodiu 45% și se agită. După separarea fazelor, se înlătură faza apoasă și se ia, într-o eprubetă, 1 ml din faza toluenică. Se adaugă 10 ml NaOH 0,1 N în etanol, se agită, se lasă în repaus 10 minute, apoi se introduc, agitînd puternic după fiecare adaus, 2 ml sulfat feriamoniacal și 2 ml sulfocianură de mercur. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 460$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 50 și 250 μg HCH [se iau 1—5 ml soluție standard de lucru (1 ml = 50 μg reactiv 7, a) se completează volumul la 50 ml toluen, se adaugă 50 ml Na_2NO_3 45%, se agită, se ia 1 ml din faza toluenică și se continuă în condițiile probei]. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a HCH, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg HCH la m^3 aer :

$$\text{mg HCH/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația HCH, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

b) *Apă*

Reziduul obținut de la extragerea cu solvenți (v. Izolare, pt. b, 2) se dizolvă în 10 ml toluen, se adaugă 2 ml soluție NaOH 0,1 N în eetanol, se agită, se lasă în repaus 15 minute, apoi se introduc, agitînd puternic după fiecare adaus, 0,4 ml sulfat feriamoniacal și 0,4 ml sulfocianură de mercur. Se citește extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 460$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 0,4 și 4 kg HCH (se iau 0,4 ; 0,8 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ml) soluție etalon de lucru (1 ml = 5 μg) (reactiv 7 b), se completează la 10 ml cu toluen și se prelucrează în condițiile probei. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a HCH, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg HCH la litru apă

$$\text{mg HCH/litru apă} = \frac{C}{V} 1\,000$$

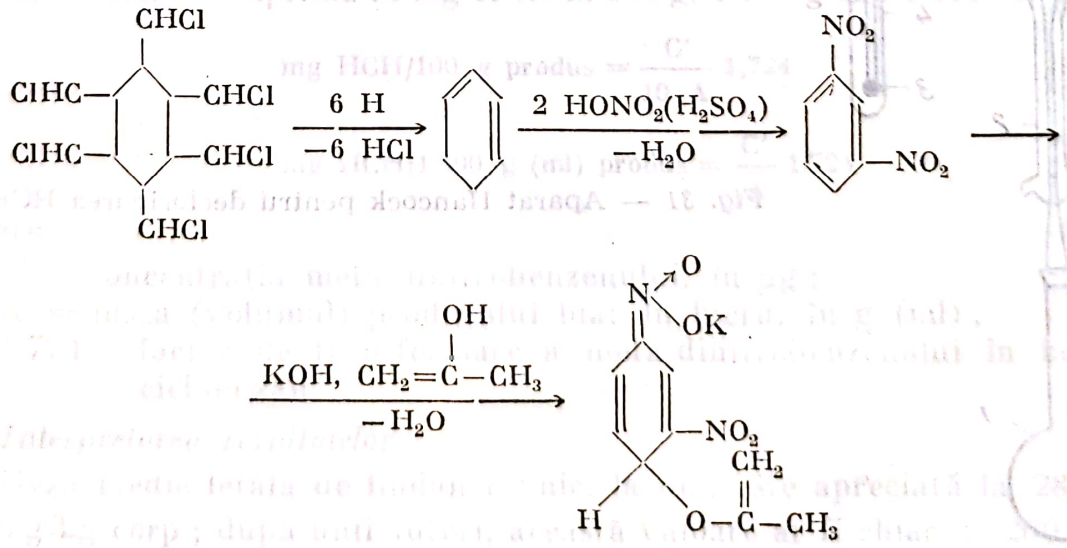
în care :

C = concentrația HCH, în μg ;
V = volumul de apă luat în lucru, în ml.

2. *Metoda spectrofotometrică (pentru produse biologice, alte produse)*

Principiu

Hexaclorciclohexanul (HCH) este declorinat la benzen, în aparatul Hancock, cu ajutorul hidrogenului în stare născîndă și în prezența acidului malonic. Benzenul este tratat cu amestec sulfonitric, cu formare de metadinitrobenzen. Acesta, tratat cu hidroxid de potasiu în mediu de acetonă formează un compus violet, colorimetrabil :



Metoda este sensibilă, dar nespecifică, deoarece interferează compușii care, în condițiile menționate, dau naștere la benzen.

Reactivi

1. Acid acetic glacial. 2. Acid malonic. 3. Zinc amalgamat. 4. Amestec nitrat. Se amestecă, răcind sub robinet, 1 volum acid azotic fumans, d = 1,50 și 1 volum acid sulfuric d = 1,84. Se păstrează în sticle brune, maximum 2 săptămîni. 5. Eter etilic. 5. Hidroxid de sodiu 2%. 7. Sulfat de sodiu anhidru. 8. Acetonă. 9. Hidroxid de potasiu 10% în etanol. 10. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,5000 g HCH și se aduc la 100 ml cu acid acetic glacial (1 ml = =5 mg). 11. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu acid acetic glacial în proporție de 1 : 100 (1 ml = 50 μg HCH).

Modul de lucru

Reziduul obținut de la extragerea cu solvenți organici se dizolvă în 1—2 ml acid acetic glacial și se aduce cantitativ, prin reluări cu cîte 2—3 ml acid acetic glacial în balonul unui aparat Hancock (fig. 31).

Se adaugă în balon 2 g acid malonic, 1 g zinc amalgamat și 2 perle de sticlă. Extremitatea refrigerentului, terminat cu o placă de sticlă sinterizată (frită), este introdusă într-o eprubetă ce conține 5 ml amestec nitrant. Eprubeta este scufundată într-un recipient cu ghiață. Se reglează temperatura în refrigerent la aproximativ 20°C prin modificarea debitului de apă, pentru a evita condensarea benzenului. Se încălzește balonul pe o baie de nisip, asigurînd degajarea continuă și uniformă a dioxidului de carbon (rezultat din decarboxilarea acidului malonic, $HOOC-CH_2-COOH$), respectiv barbotarea benzenului în amestecul nitrat. După 90 minute de la începutul încălzirii, se lasă să se răcească, se demontează aparatul, se scoate extremitatea refrigerentului din amestecul intrat și se spală de două ori cu cîte 2 ml apă. Se trece conținutul eprubetei, prin reluări de cîte 5—10 ml apă, într-o pîlnie de separare și se extrage de două ori cu cîte 30 ml eter etilic. Fazele eterice se spală

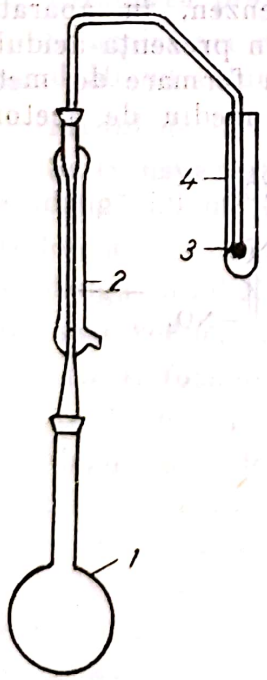


Fig. 31 — Aparat Hancock pentru declorinarea HCH.

de două ori cu cîte 25 ml NaOH 2%. Dacă soluția alcalină este galbenă, se continuă spălarea cu NaOH 2% pînă ce rămîne incoloră. Faza eterică se trece pe un filtru conținînd sulfat de sodiu anhidru, se colectează într-o eprubetă și se evaporă la sec la temperatura laboratorului. Reziduul se dizolvă în acetonă și se aduce cantitativ, cu acetonă, într-un balon cotat de 25 ml. La 2,5 ml din această soluție se adaugă 0,2 ml KOH 10% în etanol. Se citește extincția, după 10 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 565$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 200 μg HCH (se iau 0,4—4 ml soluție standard de lucru, se aduc la 4 ml cu acid acetic glacial și se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 10 — deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă — obținîndu-se concentrația C, a HCH, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg HCH la 100 g, 1 000 g sau 1 000 ml produs :

$$\text{mg HCH/100 mg produs} = \frac{C}{10\,A}$$

$$\text{mg HCH/1 000 g (ml) produs} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația HCH, în μg ;
A = masa (volumul) de produs luat de lucru, în g (ml).

Observație

Curba de etalonare poate fi preparată și dintr-o soluție de meta-dinitrobenzen în acetonă (1 ml = 0,1 mg m. dinitrobenzen). Se iau 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 1,25 și 1,50 ml din această soluție (corespunzînd la 25—150 μg meta-dinitrobenzen) se aduc la 2,5 ml cu acetonă și se adaugă 0,2 ml KOH 10% în etanol. Se construiește curba etalon. Valoarea extincției pentru probă se raportează la această curbă etalon, apoi se înmulțește cu 10 (deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă) obținîndu-se concentrația C′ a meta-dinitrobenzenului, în μg, în probă.

Rezultatele se exprimă în mg HCH la 100 g, 1 000 g sau 1 000 ml produs :

$$\text{mg HCH/100 g produs} = \frac{C'}{10 \cdot A}\,1{,}724$$

$$\text{mg HCH/1 000 g (ml) produs} = \frac{C'}{A}\,1{,}724$$

în care :

C′ = concentrația meta-dinitrobenzenului, în μg ;
A = masa (volumul) produsului luat în lucru, în g (ml) ;
1,724 = factor de transformare a meta-dinitrobenzenului în hexaclorciclohexan.

Interpretarea rezultatelor

Doza medie letală de lindan tehnic, la om, este apreciată la 28 g sau 400 mg/kg corp ; după unii autori, această valoare ar fi chiar de 200 mg/kg.

Scanned with OKEN Scanner

La concentrații sanguine de peste 0,02 mg litru se decelează modificări ale EEG la persoanele expuse cronic. Într-un caz de intoxicație cu 1,6 g HCH la copil s-au găsit concentrații plasmatice de 0,84 mg/litru după 2 ore și de 0,49 mg/litru după 4 ore. În alt caz, fatal, s-au decelat 343 mg/Kg HCH în țesutul adipos.

3. *Metoda cromatografică în strat subțire (pentru apă)*

Se dizolvă reziduul obținut la extragerea cu solvenți organici (v. Izolare, pt. b, 1 și 2) în 0,5 ml acetonă și se spotează pe cromatoplacă o cantitate de soluție în care să existe minimum 1 μg HCH în spot, în paralel cu etaloane conținînd 1, 5, 10 și 20 μg HCH.

Agentul de migrare este hexanul normal. După migrare, placa se usucă la temperatura laboratorului timp de 2 minute, apoi se plasează la etuvă la 60°C timp de 10 minute.

Revelarea se realizează prin pulverizare cu amestec (preparat extemporaneu) din soluția A (0,3 g azotat de argint dizolvat în 5 ml apă bidistilată, la care se adaugă 70 ml etanol) și soluția B (15 ml acetonă și 10 ml 2-fenoxi-etanol). După pulverizare, se usucă placa din nou 5 minute la 60°C, apoi se expune la lumina U.V. timp de 10 minute, cînd apar spoturi colorate în brun, care se compară vizual cu spoturile obținute pentru etalonare.

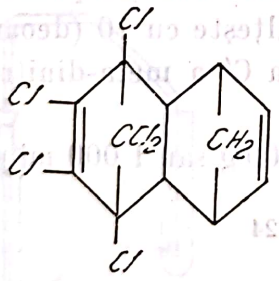
Rezultatul se exprimă în μg HCH la litru de apă :

$$\mu \text{ HCH/litru apă} = \frac{C}{V} 1\,000$$

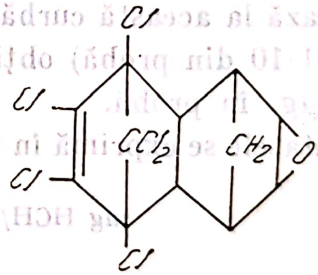
în care :

C = concentrația HCH, în μg ;
V = volumul de apă luat în lucru, în ml.

II.7.3. ALDRINUL, DIELDRINUL ȘI ENDRINUL



Aldrin



Dieldrin și endrin (stereoizomeri)

A. **Izolare**

Compușii de tip aldrinic se extrag din mediu acid sau alcalin, cu n. hexan, eter de petrol, eter etilic. Se hidrolizează extractul organic cu hidroxid de sodiu (acești compuși se acumulează în țesutul gras). Se îndepărtează săpunurile formate din saponificarea grăsimilor prin spălare repetată cu apă Extractul organic, debarasat de grăsimi, se evaporă la sec. Reziduul se reia în cloroform și se purifică prin trecere pe o coloană de Al_2O_3. Se evaporă eluatul la sec.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

— pentru *Aldrin* și *Dieldrin*

a) *Reacția Johnson :* reziduul reluat în 2 ml benzen este tratat cu 2 ml acid sulfuric fumans (cu minimum 6% SO_3), cînd apare o coloraţie roşie. În altă variantă, reziduul se reia cu 2 ml benzen, se iau 3 picături din soluția benzenică, se adaugă 2 ml acid sulfuric fumans, se agită, se adaugă 3 picături xilen, se agită 30 secunde, cînd apare o coloraţie roz-roşie, care se intensifică în timp.

b) *Reacția Danish-Lidov :* reziduul se reia în n. hexan și se tratează cu fenilazidă, $C_6H_5-N=N\equiv N$. După evaporarea n. hexanului, se execută o reacție de cuplare cu sarea de diazoniu a 2,4-dinitroanilinei, cînd apare o coloraţie roşie.

— pentru *Endrin*

s) Se extrage cu n. hexan și se agită 0,3 ml din extractul hexanic cu 2 ml acid sulfuric concentrat, cînd soluția devine galbenă în prezența endrinului și rămîne incoloră în prezența aldrinului. Dacă se încălzește eprubeta cu apă fierbinte timp de 30—40 secunde și apoi se răcește, în prezența endrinului se formează o coloraţie roşie, iar în prezența aldrinului și dieldrinului, brun-gălbuie. Dacă se adaugă o picătură de amestec sulfonitric (1 : 1) în prezența endrinului apare o coloraţie verde-albastră.

2. *Cromatografie în strat subțire*
(v. Diclordifeniltricloretan)

3. *Spectrofotometrie în U.V. (maxime)*

Aldrin în etanol, 290—310
Dieldrin în etanol, 329
Endrin în etanol, 224

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (pentru Aldrin și Dieldrin)*

Principiu

Aldrinul și Dieldrinul formează cu difenilamina în prezență de clorură de zinc, o coloraţie roz-roşie, colorimetrabilă.

Reactivi

1. Difenilamină 0,25% în eter de petrol. 2. Clorură de zinc 0,25% în eter de petrol (preparat extemporaneu). 3. Acid acetic glacial. 4. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g aldrin și se aduc la 100 ml cu eter de petrol (1 ml = 1 mg). 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu eter de petrol, în proporție de 1 : 10 (1 ml = 100 μg).

Modul de lucru

Extractul se purifică prin trecere pe coloană de Al_2O_3. Se eluează cu 50 ml eter de petrol și se colectează într-o eprubetă termorezistentă. După colectarea primilor 5 mililitri, se plasează eprubeta pe o baie de apă la 60—70°C și se evaporă la sec conținutul ei. Următoarele porțiuni se colectează și se evaporă în aceeași eprubeta. Peste reziduul din eprubetă se adaugă 2 ml soluție difenilamină și 2 ml soluție clorură de zinc. Se introduce eprubeta timp de 5 minute într-o baie de ulei încălzită la 205—210°C. Se scoate

Scanned with OKEN Scanner

eprubeta, se răcește la temperatura laboratorului, apoi sub un curent de apă. Se adaugă 3 ml acid acetic glacial, se filtrează cantitativ printr-un filtru uscat și se aduce volumul la 5 ml acid acetic glacial. De citește extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 650$ nm, în cuva de 1 cm, față de acid acetic glacial.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 150 μg aldrin (se iau 0,1—1,5 ml soluție standard de lucru, se aduc la 1,5 ml cu eter de petrol, se evaporă la sec și apoi se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției probei se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a aldrinului în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg aldrin la 100 g produs biologic:

$$\text{mg aldrin/100 g produs biologic} = \frac{C}{10 \cdot A}$$

în care:

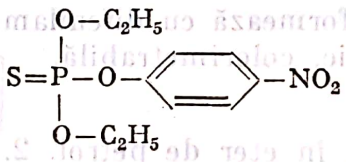
C = concentrația aldrinului, în μg;
A = masa de produs biologic luat în lucru, în g.

Interpretarea rezultatelor

Doza letală de *aldrin* la om, apreciată la 3—7 g (40—100 g/kg). Simptomele de intoxicație apar chiar la ingerare de 10 mg/kg. Într-un caz de intoxicație s-au găsit 0.28—0,13 mg/litru sînge și 60 mg/kg țesut adipos.

Doza letală de *dieldrin* la om, este apreciată la 1,5—5,0 g (izomerul Endrin este mai toxic). La concentrații sanguine de peste 0,15—0,20 mg/litru sînge apar simptomele de intoxicație. După ingerarea de 9 g s-au găsit valorile maxime de 1,16 mg/litru sînge și 80 mg/kg țesut adipos. În 3 cazuri fatale s-au decelat valorile de 0,5 mg/litru sînge și 4—25 mg/țesut adipos.

II.7.4. PARATIONUL



A. Izolare

Parationul se izolează din mediu acid cu solvenți organici. Fiind volatil, poate fi izolat și prin antrenare cu vapori de apă.

a) *Izolare din urină:* se acidulează 25—50 ml urină cu acid clorhidric 10% și se extrag, de minimum două ori, cu volume egale de eter etilic sau cloroform. Extractele organice reunite sînt filtrate printr-un filtru uscat. Filtratul este evaporat la sec pe baia de apă.

b) *Izolare din sînge:* se tratează 5—10 ml sînge cu 5—10 ml acid tricloracetic 20%. Se filtrează, iar filtratul se extrage, de minimum 2 ori, cu cîte 20 ml eter etilic. Extractele eterice reunite sînt filtrate printr-un filtru uscat. Filtratul este evaporat la sec pe baia de apă la 50°C.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Izolare din conținut stomacal :* se triturează 5—10 ml conținut stomacal cu sulfat de sodiu anhidru, pînă la obținerea unei mase pulverulente. Se extrage masa cu o cantitate dublă de eter de petrol. Extractul este evaporat la sec.

d) *Izolare din organe :* se extrag 20 g organe prin metoda Stas-Otto-Ogier. Parationul și p. nitrofenolul — principalul său metabolit — se regăsesc în eterul acid.

e) *Izolare din produse alimentare sau corpuri delicte :* se extrage o cantitate din produsul de analizat cu un volum egal de alcool etilic, într-un borcan cu dop rodat, timp de 20 minute, Se decantează și se filtrează extractul alcoolic într-un balon cotat de volum corespunzător și se completează la semn cu alcool etilic.

B. **Identificare**

1. *Teste orientative (fără izolare)*

a) *Din conținut stomacal :* 1) Se încălzește pe baia de apă o cantitate de conținut stomacal cu un volum dublu de alcool etilic absolut. Se filtrează și se evaporă filtratul la sec. Se tratează reziduul cu 1—2 ml hidroxid de sodiu 20% și se fierbe cîteva minute. Prin hidroliză se eliberează p. nitrofenolul, care în mediu alcalin, prezintă o colorație galbenă — p. nitrofenolat de sodiu — iar la acidulare, coloratia dispare — p. nitrofenol ; 2) Se concentrează, prin evaporare pe baia de apă, o cantitate de conținut stomacal pînă la 1/4 din volumul său. Se tratează cu 1 ml perhidrol și se încălzește din nou. După distrugerea, pe această cale, a substanțelor organice care ar deranja reacția, se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 20% și se fierbe cîteva minute, cînd apare o colorație galbenă.

b) *Din sînge și urină :* se deproteinizează 2—5 ml sînge sau 5—10 ml urină cu acid tricloracetic 20%. Se filtrează, se alcalinizează filtratul cu hidroxid de sodiu 20% și se fierbe cîteva minute, cînd apare coloratia galbenă.

2. *Reacții de culoare* (pe reziduu)

a) *Reacția Averell-Norris :* reziduul se tratează cu 2 ml acid clorhidric 10%. Se trece într-o eprubetă și se adaugă 1—2 granule de zinc amalgamat. Se încălzește 5—10 minute pe baia de apă la fierbere. Se filtrează, se răcește, se adaugă 0,2 ml nitrit de sodiu 0,1%. Se lasă în repaus 15 minute, apoi se adaugă 1 ml sulfamat de amoniu 10%. Se agită și se lasă în repaus 14 minute. Se adaugă 0,2 ml N-naftiletilendiamină (NED) 0,1%, cînd apare o culoare violetă.

b) *Reacția de formare a derivaților chinoniminici* 1) Reziduul se tratează cu 2 ml hidroxid de sodiu 5% și 0,5 g aliaj Dewarda (10 p. Cu, 9 p. Al, 1 p. Zn, reducător în mediu alcalin, prin hidrogenul în stare născîndă pe care-l degajă), cînd se formează p. aminofenol prin reducerea p. nitrofenolului. Se adaugă, după 15 minute, 0,4 ml ortocrezol 1% în alcool și 1—2 ml apă oxigenată. Se obține, prin cuplarea p. aminofenolului cu o crezol, un derivat chinoniminic de culoare albastră. 2) Reziduul se tratează cu 2 ml hidroxid de sodiu 5%. Se adaugă cîteva cristale de ditionit de sodiu, $Na_2S_2O_4$. După cîteva minute se distruge excesul de ditionit cu acid clorhidric 10%, apoi se adaugă 1 ml alfa-naftol 1% în alcool — sau 1 ml oxină (8-hidroxichinolină) 1% în alcool și 1 ml perhidrol. Se alcalinizează 10 *p*H 9 cu hidroxid de sodiu 10%. Se obține, prin cuplarea p. aminofenolului cu alfa-naftolul sau oxina, un derivat chinoniminic de culoare albastră.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Reacția de formare a p. nitrofenolatului de sodiu :* se tratează reziduul cu cîteva picături de perhidrol și 3—5 ml hidroxid de sodiu 20%. Se încălzește, pe baia de apă la fierbere, 15 minute. Prin hidroliză în mediu alcalin se formează p. nitrofenolatul de sodiu de culoare galbenă. Soluția se decolorează prin acidulare.

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acetonă și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este eter de petrol : acetonă (75 : 25).

Revelarea se realizează prin : a) Expunere timp de 10 minute la vapori de brom, apoi pulverizare cu clorură ferică 0,1% în etanol 80%. Se usucă și după 15 minute se pulverizează cu acid sulfosalicilic 1% în etanol 80%, cînd apar spoturi albe pe fond violet. b) Pulverizare cu iod, soluție 0,1 N, care conține 3% azidă de sodiu, cînd apar spoturi albe sau colorate pe fond galben ; în raport cu pesticidul organofosforic (paration, malation, etc.).

4. *Spectrofotometrie în U.V.*

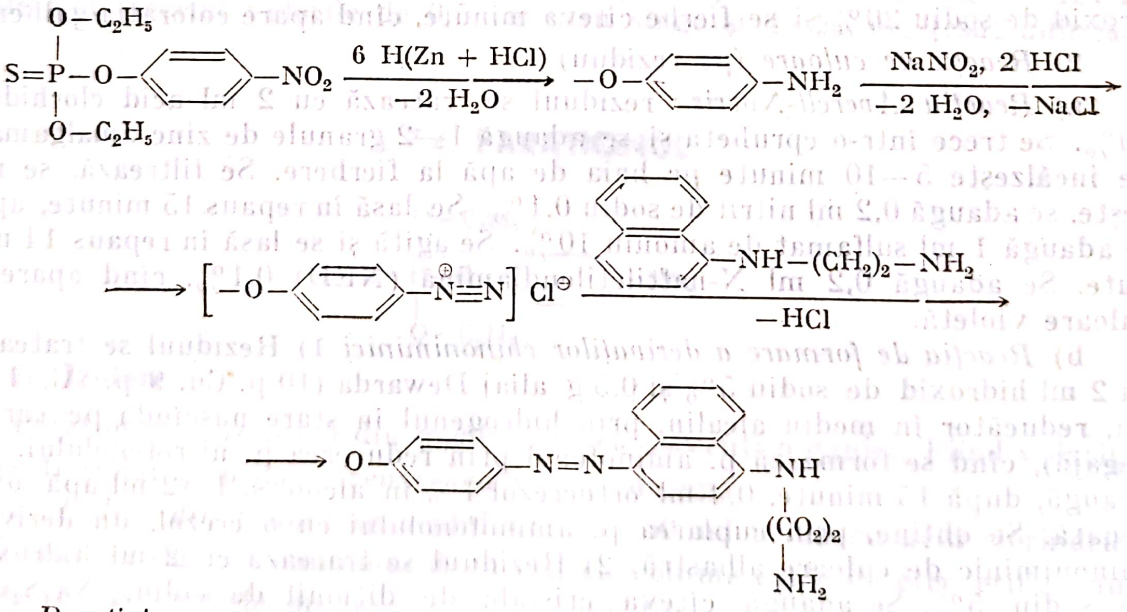
Paration în etanol, max. 274 nm.

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (reacția Averell-Norris) pentru aer*

Principiu

Gruparea $-NO_2$ din paration este redusă la gruparea NH_2. Aceasta se diazotează, iar clorura de diazoniu se cuplează cu N-naftil-etilendiamina (NED), rezultînd un azoderivat violet, colorimetrabil. Sensibilitatea metodei este de 0,1 mg paration/m³ aer.



Reactivi

1. Alcool etilic 96°. 2. Acid clorhidric N. 3. Zinc pulbere. 4. Sulfat de cupru 2%. 5. Nitrit de sodiu 0,25% (soluția se conservă maximum o săptămînă la frigider). 6. Sulfanat de amoniu 2,5% (soluția se conservă maximum două săptămîni la frigider). 7. N-naftiletilendiamină clorhidrat 1%.

8. Soluția standard stoc. Se cîntărește un balon cotat de 100 ml care conține 10 ml alcool etilic (A g). Se adaugă 3 picături de paration și se recîntărește balonul (B g). Se completează la semn cu alcool etilic. Conținutul în paration va fi: mg paration/ml = 10(B — A). 9. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic, astfel ca 1 ml = 40 micrograme paration.

Recoltarea probelor

Într-o alonjă de recoltat pulberi se așază, în ordine, începînd de la capătul său îngustat, următoarele: un tampon de vată; un strat de 0,5 g pulbere de celuloză, care se tasează pînă la uniformizarea stratului; un strat format dintr-un amestec de 0,5 g pulbere de celuloză și 0,1 g pulbere de zinc, de asemenea tasat ușor; un al doilea tampon de vată, pentru menținerea poziției stratului de pulbere de celuloză și zinc.

Alonja astfel pregătită se conectează la o pompă de vid și se aspiră, cu un debit de 5 litri/minut, un volum de aer care să conțină, în medie, 20 micrograme paration (100—200 litri aer).

Modul de lucru

Se montează alonja cu proba recoltată într-un stativ, cu ajutorul unei cleme, în poziție verticală. Se prepară un amestec din 10 ml alcool etilic, 10 ml acid clorhidric N și 2 picături sulfat de cupru. Se adaugă acest amestec peste stratul de pulbere de celuloză, culegîndu-se 10 ml eluent într-o eprubetă gradată de 30 ml. În aceeași eprubetă se adaugă: 1 ml nitrit de sodiu, se agită și se lasă în repaus 15 minute; 1 ml sulfanat de amoniu, se agită și se lasă în repaus 15 minute; 1 ml NED și se completează cu apă la 15 ml.

Se citește extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm, în cuva de 1 cm, față de amestec alcool: HCl N (1 : 1).

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 20 μg, procedînd astfel: într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se aduc 10 ml soluție standard de lucru, apoi 2 picături sulfat de cupru și maximum 100 mg pulbere de zinc. Se agită 5 minute și se filtrează prin hîrtie de filtru. Se spală precipitatul de pe filtru cu un amestec de volume egale de HCl N și alcool etilic, colectînd peste filtrat, pînă la obținerea a 40 ml soluție. Această soluție conține parationul redus (1 ml = 10 micrograme paration). Din soluție se iau, în 5 eprubete gradate de cîte 30 ml: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml. Se completează la 10 ml cu amestec de alcool etilic: HCl N (1 : 1). În continuare, se adaugă nitrit, sulfamat și NED ca la probe și în aceleași condiții se citesc extincțiile.

Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a parationului, în μg. în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg paration la m^3 aer:

$$\text{mg paration/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care:

C = concentrația parationului, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Scanned with OKEN Scanner

Observații

1. Metoda nu este specifică, putînd interfera o serie de nitro- și amino-derivați aromatici, prezenți ca impurități alături de paration. 2. Etaloanele se pot prepara și dintr-o soluție de p. nitrofenol cu concentrația exprimată în paration.

2. *Metoda spectrofotometrică (reacția Averrell-Norris) (pentru produse biologice, produse alimentare, corpuri delicte)*

Principiu

(același ca în metoda pentru aer)

Reactivi

(aceeași ca în metoda pentru aer)

a) *Produse biologice*

Modul de lucru

Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici (v. Izolare a, b, c, d) se dizolvă în cîțiva mililitri etanol de 96° și se trece cantitativ într-un balon cotat de 10 ml. Se iau într-o eprubetă 2 ml din soluția alcoolică și se adaugă 2 ml acid clorhidric 10%, 0,2 g zinc pulbere, o picătură sulfat de cupru. Se lasă 10 minute, agitînd periodic. Se pregătește un filtru umectat cu amestec alcool etilic : acid clorhidric N (1 : 1) și se filtrează conținutul eprubetei, culegîndu-se filtratul într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se spală filtrul cu 1 ml amestec alcool : HCl N (1 : 1) care se colectează tot în eprubetă. Se adaugă în eprubetă : 0,1 ml nitrit, se agită și se lasă în repaus 15 minute, 1 ml sulfanat, se agită și se lasă în repaus 15 minute ; 0,5 ml NED, se agită și se aduce la 10 ml cu amestec alcool : HCl N (1 : 1) Se citește extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 50 μg paration 12 ml alcool : se iau din soluția standard de lucru (1 ml = 40 μg) următoarele cantități : 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,25 ml, se completează la 2 ml cu alcool și se prelucrează ca și probele.

Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 5 (deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă) obținîndu-se concentrația C a parationului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg paration la 100 ml (g) sînge sau organe și la 1 000 ml urină sau conținut stomacal :

$$\text{mg paration/100 ml (g) sînge, organe} = \frac{C}{10\ A}$$

$$\text{mg paration/1 000 ml urină, conținut stomacal} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația parationului, în μg ;
A = masa (volumul) de produs luat în lucru, în g (ml).

b) *Produse alimentare, corpuri delicte*

Modul de lucru

Într-o eprubetă cu dop rodat se iau : 5 ml extract alcoolic (v. Izolare, e), 5 ml acid clorhidric N, 0,2 h zinc pulbere, o picătură de sulfat de cupru. Se acoperă cu dopul și se lasă 10 minute, agitînd periodic. Se pregătește un filtru de vată spălat cu amestec alcool : HCl N (1 : 1) și se filtrează conținutul eprubetei, culegîndu-se filtratul într-un balon cotat de 25 ml. Se spală filtrul cu 2—3 ml amestec alcool : HCl N (1 : 1), care se colectează tot în balonul cotat. Se adaugă în balon : 0,2 ml nitrit, se agită și se lasă în repaus 15 minute, 1 ml sulfamat, se agită și se lasă în repaus 15 minute, 0,5 ml NED, se agită și se aduce la 25 ml cu amestec alcool : HCl N (1 : 1). Se citește extincția după 15 minute la spectrofotometru, la $\lambda = 555$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 60 μg paration /5 mg alcool : se iau din soluția standard de lucru (1 ml = 40 μg) următoarele cantități : 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,25 ; 1,50 ml, se completează la 5 ml cu alcool și se prelucrează ca și probele.

Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu raportul volumul extract total/alicot (de ex. dacă extractul alcoolic inițial a fost de 100 ml și s-a lucrat cu 5 ml, se înmulțește cu 20), obținîndu-se concentrația C a parationului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg paration la kilogram produs :

$$\text{mg paration/kg produs} = \frac{C}{A}$$

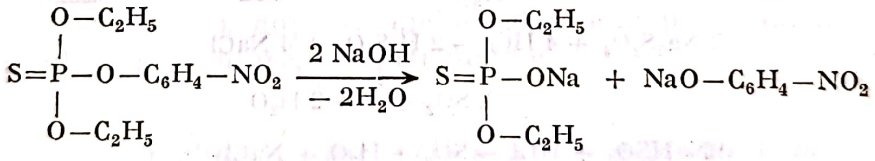
în care :

C = concentrația parationului, în μg ;
A = masa produsului luat în lucru, în g.

3. *Metoda spectrofotometrică (formarea p. nitrofenolatului de sodiu)*

Principiu

Parationul este hidrolizat la p. nitrofenol în mediu alcalin, cînd se formează p. nitrofenolat de sodiu, de culoare galbenă, colorimetrabil :



Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 30% ; 2. Soluția standard stoc ; 3. Soluție standard de lucru (v. metoda de dozare prin reacția Averrell-Norris).

Modul de lucru

Reziduul obținut de la extragerea cu solvenți organici este tratat cu cîțiva mililitri de hidroxid de sodiu 30% și menținut pe baia de apă la fierbere cîteva minute. Lichidul colorat în galben în urma formării p. nitrofenolatului de sodiu este trecut cantitativ într-un balon cotat de 25 ml. Se completează balonul la semn cu apă. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 415$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 200 μg paration (0,5—5,0 ml soluție standard de lucru, 1 ml = 40 μg, tratate în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a parationului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg paration la 100 ml (g) sînge sau organe și la 1 000 ml (g) urină, conținut stomacal, sau produs alimentar :

$$\text{mg paration/100 ml (g) sînge, organe} = \frac{C}{10\,A}$$

$$\text{mg paration /1 000 ml (g) urină, conținut stomacal, produs alimentar} = \frac{C}{A}$$

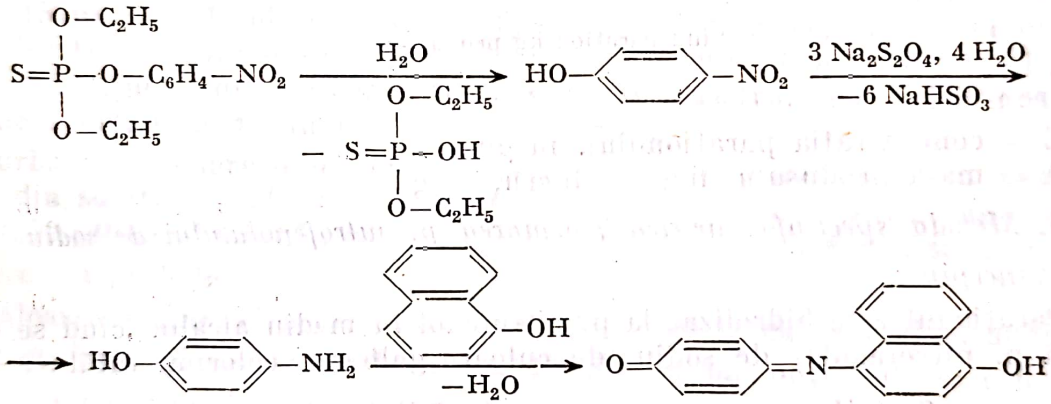
în care :

C = concentrația parationului, în μg ;
A = masa (volumul) de produs luat în lucru, în g (ml).

4. *Metoda spectrofotometrică (formarea unui derivat chinonimic)*

Principiu

Parationul este hidrolizat la p. nitrofenol. Acesta este redus cu ditionit la p. aminofenol. Excesul de ditionit este redus în prezența acidului clorhidric (care distruge și sulfitul acid) P. aminofenolul este cuplat cu alfa-naftolul sau oxina, în mediu alcalin, cu formarea unei derivat chinoniminic de culoare albastră. Sensibilitatea metodei este de 1 μg/ml.



$$3\,Na_2S_2O_4 + 4\,HCl \rightarrow 2\,H_2S_2O_4 + 4\,NaCl$$

$$2\,SO_2 + S + 2\,H_2O$$

$$NaHSO_3 + HCl \rightarrow SO_2 + H_2O + NaCl$$

Reactivi

1. Hidroxid de potasiu 10%. 2. Acid clorhidric 10%. 3. Ditionit de sodiu 1% (preparat extemporaneu). 4. Eter etilic. 5. Oxină (8-hidroxichinolină) 0,1% în alcool, (sau alfa-naftol 1% în amoniac 10%). 6. Perhidrol. 7. Soluție standard stoc. 8. Soluție standard de lucru 1 ml = 40 μg (v. Metoda de dozare prin reacția Averell-Norris).

Modul de lucru

Reziduul obținut de la extragerea cu solvenți organici este dizolvat în 10 ml hidroxid de potasiu 10%, se încălzește 15 minute pe baia de apă la

fierbere, se răcește și se aduce cantitativ (prin reluări cu apă) într-o pîlnie de separare. Se acidulează cu acid clorhidric 10% și se extrage de trei ori cu cîte 20 ml eter etilic. Fazele eterice reunite se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru într-o capsulă. Se evaporă sub nișă la temperatura laboratorului. Reziduul se aduce, cu mici porțiuni de apă, într-un balon cotat de 25 ml. Se adaugă 0,5 ml ditionat de sodiu și 0,5 ml acid clorhidric. Se agită și după 5 minute se adaugă 1 ml hidroxid de potasiu, 1 ml oxină (sau 1 ml alfa-naftol) și 1 ml perhidrol. Se aduce cu apă la 25 ml. Se citește extincția — după 90 minute pentru oxină și 30 minute pentru alfa-naftol — la spectrofotometru, la $\lambda = 610$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor

Curba de etalonare se întocmește între 25 și 200 μg paration (0,5—5 ml soluție standard de lucru — 1 ml = 40 μg — completate la 5 ml cu alcool și prelucrate ca și probele). Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a parationului, în μg, în probă.

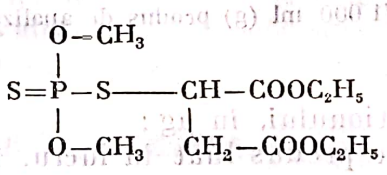
Calcul

(v. metoda precedentă)

Interpretarea rezultatelor

Doza letală de paration, la om, se înscrie între 20 și 100 mg. Pătrunderea în ochi a 0,5 ml paration poate fi fatală. În mai multe cazuri de intoxicație severă s-au găsit valori urinare de p. nitrofenol de 1,6 mg/litru pînă la 11,6 mg/litru. În 19 cazuri fatale s-au decelat următoarele valori medii și extreme de paration: 9 (0,5—34) mlg/litru sînge; 10 (0,4—78) mg/litru urină; 11 (0,1—120) mg/kg ficat.

II.7.5. MALATIONUL



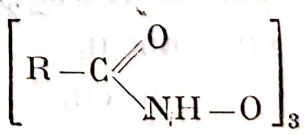
A. **Izolare**

Malationul se izolează din mediu acid sau alcalin cu solvenți organici (eter etilic, cloroform). după tehnicile indicate la paration, din produse biologice, produse alimentare, corpuri delicte.

B. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (formarea complexului hidroxamat-Fe^{3+})*

Principiu

Malationul, conținînd gruparea carbonil, reacționează cu hidroxilamina în mediu alcalin, cu formare de hidroxamați, care cu clorura ferică dă un complex roșu, de tip Hantzsch, de forma  Fe, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 10 μg/ml. Metoda este comună esterilor acetici.

Reactivi

1. Alcool etilic 95°. 2. Hidroxilamină clorhidrică, 20% (se poate conserva maximum două săptămîni la frigider, este însă preferabil să se prepare extemporaneu). 3. Hidroxid de sodiu 20%. 4. Acid clorhidric, 50% (v/v). 5. Clorură ferică 12%. Se dizolvă 12 g $FeCl_3$, 6 H_2O în 100 ml HCl 0,1 N. 6. Soluție standard stoc. Se aduc 0,5000 g malation la 100 ml cu alcool etilic (1 ml = 5 mg). 7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic în proporție de 1 : 50 (1 ml = 100 μg) malation.

Modul de lucru

Reziduul de la extragerea cu eter (cloroform) este adus într-o eprubetă gradată de 20 ml cu 5 ml alcool etilic. Se adaugă 2 ml hidroxilamină și 2 ml hidroxid de sodiu. Se lasă în repaus 5 minute și se adaugă 2,5 ml acid clorhidric și 1 ml clorură ferică apoi se aduce cu apă la 15 ml. Se citește extincția probei la o spectofotometru la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 1 cm față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 20 și 100 μg malation/5 ml alcool (se iau 0,2—1,0 ml soluție standard de lucru, se completează la 5 ml cu alcool și se prelucrează ca la probe). Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a malationului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg malation/100 ml (g) sau în mg malation/1 000 ml (g) produs de analizat :

$$\text{mg malation/100 ml (g) produs de analizat} = \frac{C}{10\ A}$$

$$\text{mg malation/1 000 ml (g) produs de analizat} = \frac{C}{A}$$

în care :

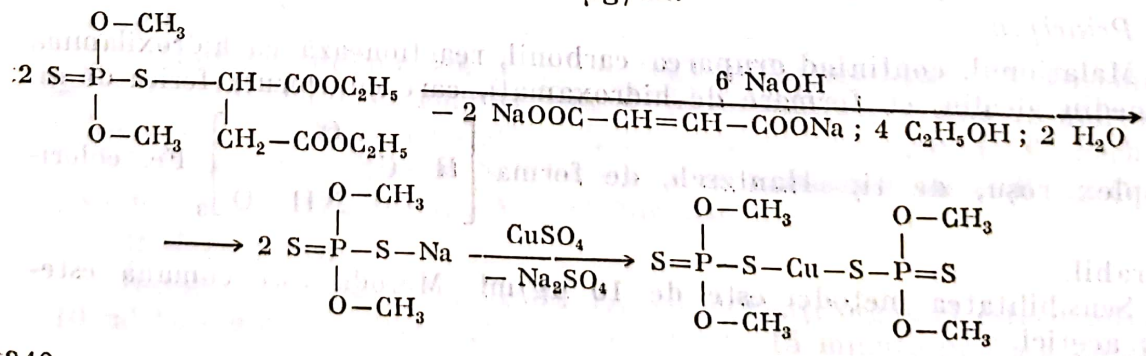
C = concentrația malationului, în μg ;
A = volumul (masa) de produs luat în lucru, în ml (g).

2. *Metoda spectrofotometrică (formarea dimetilditiofosfatului de Cu^{2+})*

Principiu

Prin hidroliza malationului în mediu alcalin rezultă dimetil-ditiofosfatul de sodiu care formează cu Cu^{2+}, dimetilditiofosfat de cupru, de culoare galbenă, extractibil în tetraclorură de carbon.

Sensibilitatea metodei este de 10 μg/ml.



Reactivi

1. Hidroxid de sodiu 6 N; 2. Clorură ferică. Se dizolvă 0,2 g clorură ferică în cîţiva mililitri apă, se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat şi se completează la 100 ml cu apă; 3. Fenolftaleină 1% în alcool; 4. Acid clorhidric 5 N; 5. Sulfat de cupru 1%; 6. Tetraclorură de carbon; 7. Soluţie standard (v. metoda precedentă).

Modul de lucru

Reziduul de la extragerea cu solvenţi organici este tratat cu 1 ml hidroxid de sodiu şi 25 ml clorură ferică. Se agită şi se lasă în repaus 5 minute, apoi se neutralizează cu acid clorhidric în prezenţă de fenolftaleină. Se aduce cantitativ într-o pîlnie de separare, se adaugă 2 ml sulfat de cupru şi se extrage de două ori cu cîte 5 ml tetraclorură de carbon. Extractele organice reunite se centrifughează. Se citeşte extincţia la spectrofotometru, la $\lambda = 470$ nm, în cuva de 1 cm, faţă de tetraclorură de carbon.

Curba de etalonare se întocmeşte între 20 şi 200 μg malation (0,2—2 ml soluţie standard de lucru, 1 ml = 100 μg malation, prelucraţi ca la probe). Valoarea extincţiei pentru probe se raportează la curba etalon, obţinîndu-se concentraţia C a malationului, în μg, în probă.

Calcul

(v. metoda precedentă)

Interpretarea rezultatelor

La om doza letală medie de malation este apreciată la 60 grame. Ingerarea de 14 h a determinat, la adult, simptome de intoxicaţie severă. În 4 cazuri fatale prin ingerare de 25—70 g malation, în scop de sinucidere, s-au decelat următoarele valori medii şi extreme: 815 (100—1 180) mg/litru sînge; 1 215 (200—1 700) mg/kg ficat.

II.7.6. COLINESTERAZA

A. Teste rapide

a) *Testul cu albastru de bromtimol*

a) Se împregnează o bandă de hîrtie de filtru, întîi în soluţie de acetilcolină 4.0,01 M, apoi în soluţie de albastru de bromtimol 0,1% în alcool. Se spotează 1—2 picături de aer de analizat, proaspăt. Se apreciază activitatea colinesterazică după timpul de modificare a culorii spotului, astfel: activitate normală 7—18 minute; activitate scăzută 20—30 minute; activitate foarte scăzută 35—150 minute.

b) *Testul cu acid 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic.* 1) *În conţinut stomacal:* În două eprubete, M (martor) şi P (proba) se introduc:

Eprubeta/reactivii	*M*	*P*
Soluţie de acid ditio-bis-nitrobenzoic (ml)	3	3
Iodură de acetilcolină 5% (ml)	0,1	0,1
Ser normal (microlitri)	20	20
Apă distilată (ml)	0,2	—
Conţinut stomacal filtrat (ml)	—	0,2

Scanned with OKEN Scanner

Se lasă în repaus 2 minute. Absența unei diferențe de culoare între cele două eprubete indică prezența compușilor organofosforici sau a altor inhibitori ai colinesterazei.

Soluție de acid 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoic : se dizolvă 10 mg acid 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic în 100 ml tampon fosfat *pH* = 7,4. 2) *În sînge :* În două eprubete M (martor) și P (probă) se introduc :

Eprubeta/reactivii	*M*	*P*
Soluție de acid ditio-bis-nitrobenzoic (ml)	3	3
Iodură de acetilcolină 5% (ml)	0,1	0,1
Ser normal (microlitri)	20	—
Ser de cercetat (microlitri)	—	20

Se lasă în repaus 2 minute. Absența unei diferențe de culoare între cele două eprubete indică prezența compușilor organofosforici sau a altor inhibitori ai colinesterazei.

B. **Dozare**

1. *Metodă spectrofotometrică rapidă*

a) *Varianta I (tehnica I.M.F. Cluj-Napoca)*

Principiu

Colinesteraza serică (pseudocolinesteraza) eliberează tiocolină prin hidroliza butiriltiocolinei. Tiocolina reacționează cu acidul 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic, (DTNB) formînd un compus colorat galben, cu maximum de absorbție la 412 nm (E_{mM} = 13,6).

Reactivi

1. Substrat : se dizolvă unul din cele 5 comprimate aflate în cutia nr. 1 în 5 ml apă bidistilată, prin agitarea ușoară a eprubetei. Soluția este stabilă maximum două săptămîni la 4°C.

2. Reactiv de culoare : se dizolvă comprimatul aflat în cutia nr. 2 într-un volum de aproximativ 50 ml apă bidistilată. Pentru accelerarea dizolvării se poate fărîma comprimatul cu o baghetă de sticlă. Se trece soluția într-un cilindru gradat de 250 ml și se completează volumul la 130 ml cu apă bidistilată. Se adaugă 120 ml etanol 95°. Soluția este stabilă la temperatura laboratorului timp de mai multe luni.

3. Serul de analizat : se diluează 1/11, pipetînd într-un tub de hemoliză 0,2 ml NaCl 0,9% și 0,02 ml ser (se folosesc micropipete destinate dozării hemoglobinei). Serul de cercetat poate fi păstrat nediluat maximum o săptămînă la 4°C.

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru

Pentru fiecare determinare se pregătesc două tuburi de hemoliză, martor (M) și probă (P) în care se pipetează :

Eprubeta/reactivii	*M*	*P*
Substrat (ml)	0,20	0,20
ser diluat 1/11 (ml)	—	0,02
Se incubează 10 minute la 25°, apoi se pipetează :		
Reactiv de culoare (ml)	2,00	2,00
Ser diluat 1/11 (ml)	0,02	—

Se citește extincția probei (EP) la $\lambda = 412$ nm față de martor, la un interval de maximum 15 minute de la adăugarea ultimului reactiv.

Calcul

Unitatea (U) de activitate enzimatică este corespunzătoare cantității de enzimă care hidrolizează 1 μmol butiriltiocolină în timp de un minut la temperatura de 25°C. Activitatea serică se exprimă în U/L.

U/L colinesterază = 8 978 EP.

Valorile normale pentru condițiile descrise mai sus sînt cuprinse între 3 3 000 și 8 000 U/L ser.

Observații

1. Pentru determinări la un număr mare de subiecți (anchete epidemiologice) se recoltează 0,02 ml sînge din pulpa degetului și se introduc imediat în 1 ml apă distilată. Se spală pipeta de mai multe ori prin aspirare și refulare. Pentru determinări se folosesc 0,02 ml sînge diluat 1/51, timpul de incubare fiind prelungit la 40 minute. Se recomandă ca determinările să fie efectuate în aceași zi. U/L colinesterază = 10 410 EP. Valorile normale pentru sînge integral sînt cuprinse între 1 600 și 4 400 U/L.

2. Fotometrele de tip Pulfrich, FEK sau alte instrumente cu filtre colorate nu pot fi utilizate. Sînt adecvate spectrofotometre de orice tip, spectrocolorimetrul Spekol sau instrumente cu lampă de descărcare în gaz (Hg) prevăzute cu filtre de interferență pentru 405 nm.

3. Cutia cu comprimate se păstrează la loc răcoros, ferit de umiditate.

După deschiderea cutiei se recomandă învelirea comprimatelor rămase în staniol și păstrarea la 4°C.

b) *Varianta II*

Se aduc 3 ml soluție acid 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzoic (v. Teste rapide) la temperatura de 25°C, se adaugă 20 microlitri ser de cercetat și 0,1 ml iodură de acetilcolină 5 %. Se omogenizează.

Se citește extincția la spectrofotometru la $\lambda = 405$ nm, în cuva de 1 cm, din 30 în 30 secunde, timp de 2 minute (5 citiri), Dacă diferența de extincție dintre o citire și alta depășește valoarea de 0,2, se diluează proba de sînge cu

Scanned with OKEN Scanner

ser fiziologic în proporție de 1 : 10 și se repetă determinarea (în final, rezultatul va fi înmulțit, în acest caz, cu 10).

Se exprimă rezultatul în miliunități de colinesterază pe ml, la 25°C:

mU/ml = 23 400 × diferența de extincție în 30 secunde.

Valori normale în ser : 1 900 — 4 000 mU/ml.

Observație : în mod identic se procedează pentru dozarea rapidă a activității colinesterazei în conținutul stomacal.

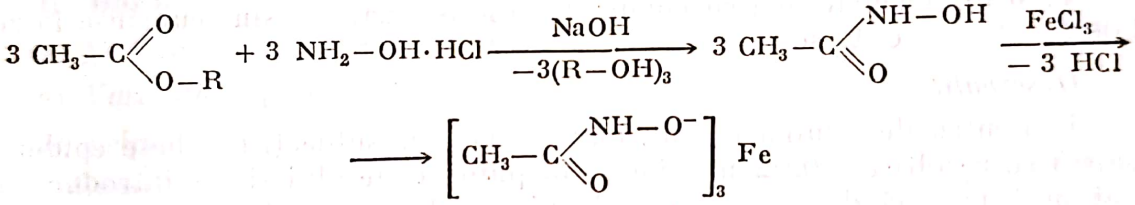
Interpretarea rezultatelor

În intoxicația cu organofosforice, valoarea pseudocolinesterazei (colinesterazei serice) scade, în formele ușoare, la 20—50%, în formele medii, cu 10—20%, iar în formele severe, sub 10% din valoarea normală. Activitatea pseudocolinesterazei scade, de asemenea, în hepatite subacute, ciroze atrofice decompensate, metastaze hepatice, distrofie musculară, caşexie tumorală, alimentație hipoproteică. Activitatea pseudocolinesterazei crește în ictere prin neoplasm, adipozitate extremă, nefroză.

2. *Metoda spectrofotometrică (formarea complexului hidroxamat-Fe^{3+})*

Principiu

Colinesteraza din sîngele total acționează asupra unui exces cunoscut de acetilcolină. Acetilcolina nehidrolizată formează cu hidroxilamina în mediu alcalin, acid acetohidroxamic, care cu Fe^{3+} dă un complex roșu, de tip Hantzsch, colorimetrabil :



Reactivi

1. Tampon veronal *p*H = 7,4. Soluția A : 20,6 g veronal sodic la litru de apă distilată. Soluția B : 3,67 g veronal la litru de apă distilată. Se amestecă 5 ml soluție A cu 95 ml soluție B. 2. Soluție stoc de acetilcolină clorhidrat 0,04 M. Acetilcolină clorhidrat 0,7266 g la 100 ml apă distilată. Se conservă la 4°C. 3. Soluție de lucru de acetilcolină clorhidrat 0,004 M. Se diluează soluția stoc de acetilcolină clorhidrat cu tampon veronal, în proporție de 1 : 10. 4. Soluție de hidroxilamină 2 M. Hidroxilamină clorhidrat 27,8 g, apă distilată ad 200 ml. Se conservă maximum 2 săptămîni la 4°C. 5. Hidroxid de sodiu 3,5 N. 6. Soluție alcalină de hidroxilamină. Se prepară extemporaneu din 1 volum de soluție 2 M de hidroxilamină și volume 2 NaOH 3,5 N. Se conservă 3 ore la temperatura laboratorului. 7. Acid percloric 1,8 M. Acid percloric d = 1,67, 18 g, apă distilată qs. ad 100 ml. 8. Clorură ferică 0,37 M. Clorură ferică, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 10 g, acid clorhidric 0,1 N qs. ad 100 ml.

Modul de lucru

Cu o micropipetă de 0,1 ml se iau 50 microlitri sînge total (recoltat pe fluorură de sodiu sau direct din pulpa degetului) și se introduc într-un tub

de hemoliză[1] conținînd 0,95 ml tampon veronal. Se spală pipeta de mai multe ori prin aspirare și refulare. În alte două tuburi de hemoliză, 2 (martor acetilcolină) și 3 (martor reactivi) se introduc :

Eprubeta/reactivii	*1 probă*	*2 martor acetilcolină*	*3 martor reactivi*
Amestec 50 µl sînge total + 0,95 ml tampon veronal (ml)	1	—	—
Tampon veronal (ml)	—	1	2
Acetilcolină 0,004 M (ml)	1	1	—
se introduc în baia termostat la 25°C pentru exact 10 minute, apoi se adaugă rapid :			
Acetilcolină alcalină (ml)	0,4	0,4	0,4
se lasă în repaus 2 minute, apoi se adaugă, agitînd după fiecare adaus :			
Apă distilată (ml)	2	2	2
Acid percloric 1,8 M (ml)	0,4	0,4	0,4
Clorură ferică 0,37 (ml) se filtrează	0,2	0,2	0,2

Se citesc extincțiile, după 15 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 520$ în cuva de 1 cm, eprubeta 1 contra eprubeta 3 (E_1) și eprubeta 2 contra eprubeta 3 (E_2).

Calcul

Micromoli de acetilcolină nehidrolizată $= 4 \cdot \frac{E_1}{E_2}$.

Activitatea colinesterazică din sînge este exprimată prin numărul de micromoli de acetilcolină hidrolizată în timpul incubării în prezența a 50 microlitri de sînge :

Activitatea colinesterazică $= 4\left(1 - \frac{E_1}{E_2}\right)$.

Valori normale $= 2{,}15 \pm 0{,}10$

Observație

Activitatea colinesterazică determinată în sîngele total se datorează hematiilor în proporție de 80%, atunci cînd valoarea hematocritului este normală.

II.7.7. METIL-MERCURUL

1. *Metoda gazcromatografică*

Principiu

În produsele alimentare de origine animală — pește, carne, ficat, ouă — metil-mercurul (MeHg) se găsește legat de materialul biologic sub formă de metil-mercaptide sau de sulfură de metil-mercur.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea metil-mercurului din aceste probe cuprinde următoarele etape: eliberarea MeHg legat, prin tratarea, omogenatului cu un acid halogenat și trecerea sub formă de Me-Hg-Hal; extragerea acestuia cu un solvent organic; purificarea extractului prin trecerea MeHg sub forma unor compuși solubili, MeHgOH sau MeHgSH, prin tratare cu NH_4OH, respectiv cu cisteină (glutation); extragerea cu solvent organic, din soluția acidulată, sub formă de MeHgHal; cromatografierea.

Pentru a evita pierderile de MeHg în timpul analizei, trebuie asigurat un *p*H puternic acid (în caz contrar, extragerea MeHg din omogenat este incompletă) și precipitarea proteinelor (în caz contrar, MeHg interacționează cu compușii de sulf din proba de analizat.

Metoda se referă la determinarea MeHg din ficat.

Reactivi

1. Acid molibdenic p.a. 2. Acid clorhidric concentrat. 3. Clorură de sodiu p.a. 4. Benzen. 5. Soluție 1% acetat de cisteină saturată cu sulfat de sodiu (1 g cisteină clorhidrică, 0,775 g acetat de sodiu crist., 125 g sulfat de sodiu anhidru, apă ad 100 ml). 6. Clorură de sodiu 6 N. 7. Sulfat de sodiu anhidru.

Modul de lucru

Se omogenizează 10 g ficat cu apă și se trec într-o pîlnie de separare de 100 ml, utilizîndu-se în total 55 ml apă. Se adaugă 1 g acid molibdenic (pentru precipitarea proteinelor) și se agită 30 secunde. Se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat și 10 g clorură de sodiu. Se omogenizează și se extrage timp de 5 minute cu 70 ml benzen. Se centrifughează. Se trec 50 ml extract benzenic într-o pîlnie de separare. Se adaugă 6 ml soluție 1% acetat de cisteină saturată cu sulfat de sodiu, se agită puternic 2 minute și se centrifughează. Se iau 2 ml supernatant (soluție apoasă), se adaugă 1,2 ml clorură de sodiu soluție 6 N și se extrag în 4 ml benzen. Se separă fazele și extractul benzenic se trece pe sulfat de sodiu anhidru, în vederea gazcromatografierii.

Gazcromatografierea

Coloană: 1,5 m × 2 mm diametru interior, din sticlă

Umplutură: 5% L_{728} (dietilenglicolsuccinat) pe Chromosorb W 60—80 mesh silanizat

Detector cu captură de electroni

Temperatura coloanei, 132°C

Temperatura injectorului, 150°C

Gaz purtător: azot 65 ml/min.

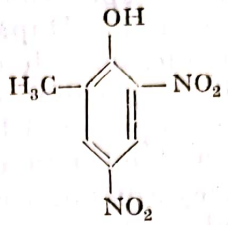
Cantitatea injectată 2 µl

Limită de detecție: 0,4 ng

Evaluarea cantitativă se face prin calibrare directă față de o curbă de calibrare obținută în același mod.

Scanned with OKEN Scanner

II.7.8. DINITRO-ORTO-CREZOLUL (DNOC)



A. Izolare

Dinitro-orto-crezolul (DNOC) se izolează din mediu acid cu solvenți organici.

a) *Izolare din urină :* se acidulează 20 ml urină cu acid clorhidric 10% și se extrag de două ori cu cîte 20 ml cloroform. Fazele cloroformice reunite se filtrează pe un filtru uscat și se evaporă la sec pe baia de apă.

b) *Izolare din sînge.* 1) Se triturează 3 —5 ml sînge cu 10—15 g sulfat de sodiu anhidru și 0,2—0,5 g acid tartric. Se trece cantitativ amestecul într-un flacon Erlenmeyer cu dop rodat și se agită 15 —30 minute cu 30—50 ml cloroform. Faza cloroformică se filtrează și se evaporă la sec pe baia de apă. 2) Se triturează 1 ml sînge cu 1 g amestec $NaCl + Na_2CO_3$ (9 : 1) și se agită cu 5 ml metiletilcetonă. Faza organică se filtrează și se evaporă la sec.

c) *Izolare din produse alimentare (corpuri delicte) :* se introduc 25—50 g produs alimentar (corp delict) bine mărunțit într-o pîlnie de separare și se tratează cu 1—2 ml acid clorhidric 25% și se extrag de două ori cu cîte 10—20 ml eter etilic, agitînd (moderat) timp de 10 minute. Fazele eterice reunite se filtrează pe un filtru uscat și se evaporă la sec la temperatura laboratorului.

d) *Izolare din apă* : se acidulează 250—500 ml apă cu acid sulfuric concentrat (2 ml H_2SO_4) pentru fiecare 100 ml apă). Se extrage de trei ori cu cîte 50 ml eter etilic, agitînd cîte 3 minute. Extractele eterice se reunesc într-o pîlnie de separare care conține 100 ml apă bidistilată. După separarea fazelor faza eterică se trece pe un filtru cu Na_2SO_4 anhidru, iar filtratul se evaporă la sec, la temperatura laboratorului.

B. Identificare

1. *Teste preliminare (fără izolare)*

a) Se tratează 5 ml urină cu 1 ml acid clorhidric concentrat și 0,2—0,5 g pulbere de zinc. Se încălzește 5 minute într-o baie de apă la fierbere. Se răcește și se filtrează. Se adaugă la filtrat cîteva picături de sulfat deric 0,02 N în acid sulfuric 5%, cînd apare o coloraţie roșie.

b) Se tratează 5 ml urină cu 1 ml acid sulfuric 10% și 1 ml nitrit de sodiu 1%. Se agită și se lasă la întuneric 10 minute. Se adaugă 2 ml betanaftol 0,5% în amoniac 10%. Se agită, apoi se adaugă 10 ml eter etilic. Stratul eteric se colorează în roșu sau vișiniu în prezenţa metaboliţilor aminici ai DNOC.

c) Se tratează 1 ml sînge cu 10 ml metiletilcetonă și 1 g amestec de 9 p clorură de sodiu și 1 p. carbonat de sodiu. La agitare apare o coloraţie galbenă.

Scanned with OKEN Scanner

2. *Reacții de culoare (pe reziduu)*

a) Reziduul se reia cu 2 ml apă, apoi se adaugă 2 ml acid sulfuric 20% și 2 granule de zinc amalgamat. După 15 minute se filtrează. Filtratul se tratează cu 1—2 picături bicromat de potasiu 5% (sau cu alt oxidant : apă oxigenată, nitrit de sodiu 1%, sulfat ceric 0,02 N, cloramină T 4%) cînd apare o colorație roșie, atît în prezența DNOC, cît și a altor dinitrofenol.

b) Reziduul se tratează cu 2 ml acid clorhidric 10%, apoi se adaugă puțin zinc pulbere și se încălzește 5 minute în baia de apă la fierbere. Se răcește și se filtrează. Filtratul se tratează cu 0,1 ml nitrit de sodiu 0,1%. După 5 minute se distruge excesul de nitrit cu 1 ml soluție de uree 10%, iar după alte 5 minute se adaugă 1 ml soluție N-naftiletilendiamină 0,1%, cînd apare o colorație violetă. Reacția este interferată de paration și de alți compuși cu grupări nitro sau amine aromatice primare.

3. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml acetonă sau cloroform și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemul de migrare este cloroform : acetonă (9 : 1).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu soluție 1% de hidroxid de potasiu în amestec apă-etanol (1 : 1). Se obțin spoturi galbene pe fond alb. În aceste condiții se separă și 2,6-dinitro-4-sec. butil-fenol (Dibutox, DNBF).

4. *Spectrofotometrie în U.V.*

Dinitro-orto-crezol în HCl 0,1 N : 268

Dinitro-orto-crezol în NaOH 0,1 N : 265, 370, 409

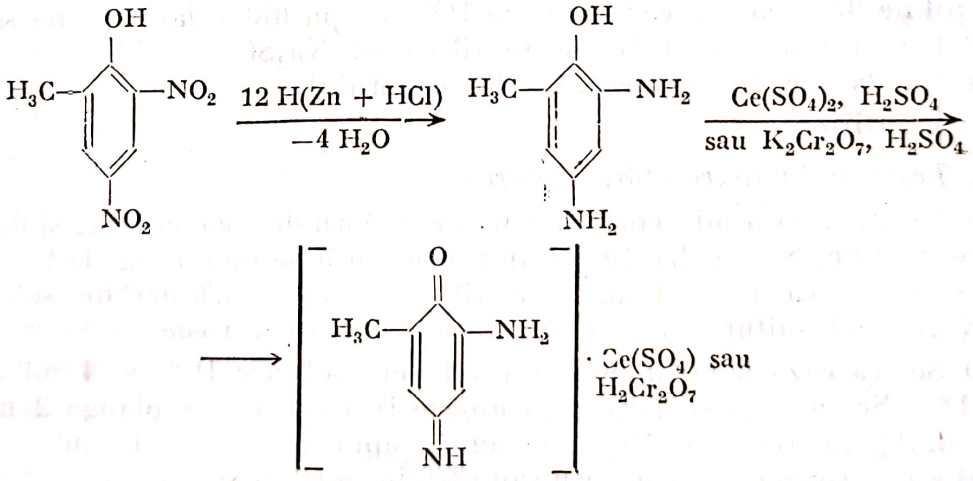
C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (formarea unui derivat chinoniminic)*

Principiu

Dinitro-orto-crezolul este redus cu zinc și acid clorhidric la aminoderivatul corespunzător, care cu un oxidant — sulfat ceric, dicromat de potasiu — formează un derivat chinoniminic de culoare roșie, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 5 micrograme/ml.



a) *Aer, produse biologice*

Reactivi

1. Soluție absorbantă, NaOH 1% ; 2. Acid clorhidric concentrat 3. Zinc amalgamat ; 4. Sulfat ceric 0,02 N în acid sulfuric 5% ; 5. Soluție stan-

dard: se cîntăresc 0,1000 g DNOC și se aduc la 1 000 ml cu apă (1 ml = 100 micrograme DNOC).

Recoltarea probelor de aer

Se aplică 15—20 litri aer cu un debit de 10 litri/oră printr-un microabsorbitor conținînd 2 ml soluție absorbantă.

Modul de lucru

La 1 ml soluție din microabsorbitor se adaugă 2 ml apă distilată; reziduul obținut la extragerea cu solvenți organici (v. Izolare, a, b) se dizolvă în 3 ml apă distilată. În ambele cazuri se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat și 1—2 granule de zinc amalgamat. Se încălzește 5 minute pe baia de apă la fierbere. Se răcește și se filtrează într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se adaugă 0,1 ml sulfat ceric și se completează la 10 ml cu apă distilată. Se citește extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 490$ nm, în cuva de 1 cm față de apă distilată.

Curba de etalonare se întocmește între 10 și 200 μg DNOC /3 ml (0,1—2 ml soluție standard completați la 3 ml cu apă și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a DNOC, în μg, în 1/2 din probă (pentru aer) și în probă (pentru produse biologice).

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DNOC la m³ aer, 100 ml sînge și 1 000 ml urină:

$$\text{mg DNOC/m}^3\text{ aer} = 2\,\frac{C}{V}$$

$$\text{mg DNOC/100 ml sînge} = \frac{C}{10 \cdot A}$$

$$\text{mg DNOC/1 000 ml urină} = \frac{C}{A}$$

în care:

C = concentrația DNOC, în μg;
V = volumul de aer recoltat, în litri;
A = volumul de sînge (urină) luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor

Doza letală de DNOC, la om, este apreciată la 200 mg.

La concentrații sanguine în jur de 20 mg DNOC/litru sînge apar simptomele intoxicației. Concentrații sanguine de 40—60 mg/litru indică intoxicații severe. Se citează un caz de deces la 75 mg DNOC/litru sînge.

b) *Produse alimentare (corpuri delicte)*

Reactivi

1. Alcool etilic 93°. 2. Acid sulfuric 38%. 3. Dicromat de potasiu 1% 4. Zinc pulbere. 5. Soluție standard, 1 ml = 100 μg. (v. metoda precedentă)

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea cu solvenți organici (v. Izolare, c) se tratează cu 4 ml apă distilată, 1 ml alcool etilic, 2 ml acid sulfuric, un vîrf de spatulă de zinc pulbere. Se omogenizează cu o baghetă și se lasă în re-

paus 30 minute, apoi se filtrează într-o eprubetă gradată de 10 ml. La lichidul limpede se adaugă 0,2 ml dicromat și se completează la 10 ml cu apă distilată. Se citește extincția la spectrofotometrul, la $\lambda = 500$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 50 μg și 400 μg DNOC (0,5—4 ml soluție standard completați la 4 ml cu apă distilată și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a DNOC, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg DNOC la 1 kg produs alimentar :

$$\text{mg DCON/kg produs alimentar} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația DNOC, în μg ;
A = masa de produs alimentar luat în lucru, în g.

2. *Metoda cromatografică în strat subțire (pentru apă)*

Se dizolvă reziduul de la extragerea cu solvenți (v. Izolare, d) în 0,5 ml acetat de til și se spotează pe cromatoplacă cantități de soluție care să conțină minimum 1 μg DNOC pe spot, în paralel cu etaloane conținînd 1 μg, 3 μg, 6 μg și 25 μg DNOC.

Agentul de migrare este hexanul normal. După migrare, placa se usucă la temperatura laboratorului timp de 2 minute, apoi se plasează la etuvă la 60°, timp de 10 minute.

Revelarea se realizează prin pulverizare cu amestec (preparat extemporaneu) din soluția A (0,3 g azotat de argint dizolvat în 5 ml apă bidistilată, la care se adaugă 70 ml etanol) și soluția B (15 ml acetonă și 10 ml 2-fenoxietanol). După pulverizare, se usucă placa din nou 5 minute la 60°C apoi se expune la lumina U.V. timp de 10 minute, cînd apar spoturi colorate în galben care se compară vizual cu spoturile obținute pentru etaloane.

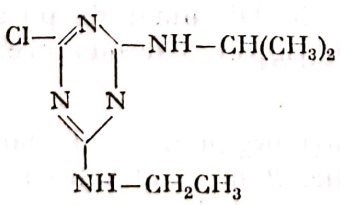
Rezultatul se exprimă în μg DNOC la litru apă :

$$\text{μg DNOC/litru apă} = \frac{C}{V} 1\,000$$

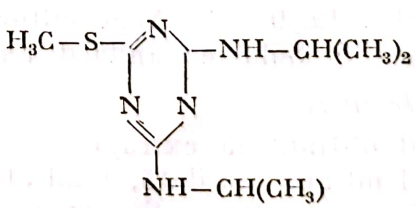
în care :

C = concentrația DNOC, în μg ;
V = volumul de apă luat în lucru, în ml.

II.7.9. ATRAZINUL ȘI PROMETRINUL



Atrazin



Prometrin

A. **Izolare**

Atrazin și prometrin se izolează din soluții alcaline, cu solvenți organici, din aer, apă, reziduuri din produs alimentare (v. Dozare).

B. **Identificare**

1. *Cromatografie în strat subțire (tehnica Jozefa Szöcs) (identificare din apă)*

Se alcalinizează la *p*H 9,0 cantitate de apă de cercetat, cu hidroxid de amoniu și se extrage cu diclormetan. Se purifică extractul organic prin tratare cu acid clorhidric, iar faza acidă, după alcalinizare, se extrage din nou cu diclormetan sau cloroform. Extractul organic se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru. Filtratul se evaporă la sec. Se reia reziduul cu cloroform : această soluție servește pentru determinarea cromatografică a derivaților sim. triazinici : atrazin, 2-clor,4-etilamino-6-izopropilamino,1,3,5-triazină ; prometrin, 2,4-di-izopropilamino-6-metiltio-1,3,5-triazină și simazin,2-clor, 4,6-dietilamino)-1,3,5-triazină.

Ca suport se folosesc plăci (silicagel cu adaus de 13% gips, respectiv cu adaus de fluoresceină 0,05% în etanol) activate la minute la 110—120°C. Se spotează 50 micrograme din soluția cloroformică, în paralel cu substanțe de referință.

Sistemele de migrare optime sînt : toluen : acetonă (85 : 15) și hexan : acetonă (50 : 10).

Revelarea optimă se realizează prin : 1) pulverizare cu reactiv Dragendorff modificat, cînd apar, imediat după pulverizare, spoturi portocalii ; 2) pulverizare cu o soluție de dicromat de potasiu 0,1 M acidulat cu acid acetic concentrat, uscare la aer și tratare cu o soluție de azotat de argint 0,1 M, cînd apar spoturi galbene pe un fond roșcat.

2. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

Atrazin în etanol, 221, 263

Prometrin în H_2SO_4 0,1 N, 222.

b) *I.R. (în KBr)*

Atrazin : A(1539), B(1612), C(1334, 1389)

Prometrin : A(1171, 1510, 1592), B(1402).

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (din aer)*

a) *Atrazin*

Principiu

Atrazinul formează cu piridina, aldehidă glutaconică. În mediu acid, aceasta dă cu acidul barbituric, un compus roșu-violaceu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 0,5 μg/ml.

Reactivi

1. Metanol . 2. Acid citric p.a. soluție tampon 0,25 M, titrată cu NaOH pînă la *p*H 4. 3. Piridină p.a. soluție 70% ; 4. Hidroxid de sodiu 9 N. 5. Acid acetic glacial. 6. Acid barbituric 0,5%. 7. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g atrazin și se aduc cu metanol la 100 ml (1 ml = 1 mg atrazin).

Scanned with OKEN Scanner

8. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu metanol în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg atrazin).

Recoltarea probelor

Se aspiră aer, cu un debit de 15 litri/minut, printr-un filtru de hîrtie Whatman nr. 4 montat într-o pîlnie Palmer. Cantitatea de aer recoltat se stabilește în funcție de gradul de poluare a locului de muncă analizat.

Modul de lucru

Se scoate hîrtia de filtru din pîlnia Palmer și se spală cu 5 ml metanol, într-o capsulă. Soluția se transferă într-o eprubetă gradată de 25 gml prevăzută cu dop de plută prin care trece o tubulură de sticlă (lungimea 40 cm, diametrul 5 mm) care servește drept refrigerent de reflux. Se aduce volumul la 5 ml cu metanol (dacă este cazul), apoi se adaugă 1,25 ml tampon acid citric și 1 ml soluție piridină. Se plasează eprubetele astupate cu dopul prevăzut cu refrigerent de reflux, într-o baie de apă la fierbere, timp de 30 minute. Se răcesc la 20°C în baie de apă, apoi se aduce conținutul eprubetelor la volum final de 5 ml cu metanol (pipetat prin refrigerentul de reflux) și se adaugă 1 ml NaO H, 2 ml acid acetic glacial și 2 ml acid barbituric, agitînd după fiecare adaus.

Se citește extincția probei, după 90 minute, la spectrofotometru, la λ = = 580 nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 25 μg atrazin (0,5—2,5 ml soluție standard de lucru, completați la 5 ml cu metanol și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a atrazinului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg atrazin la m³ aer :

$$\text{mg atrazin/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația de atrazin, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

b) *Prometrin*

Principiu

Prometrinul se descompune în mediu de acid sulfuric, cu formare de 2-hidroxi-4,6-bis-izopropilamino-triazin și metilmercaptan. Metilmercaptanul formează cu N,N-dimetil-p. fenilendiamina, în mediu acid și în prezența clorurii ferice, un compus roșu, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 1,2 μg/ml.

Reactivi

1. Etanol 96°. 2. Acid sulfuric 40%. 3. Acetat de mercur 0,05%. 4. N,N-di metil-p. fenilendiamină, soluție stoc, în acid sulfuric. Se dizolvă 1,2 g N,N-dimetil-p. fenilendiamină în amestec de 3,0 ml apă distilată și 5,0 ml acid sulfuric. 5. N,N-dimetil-p. fenilendiamină, soluție de lucru. Se diluează soluția

Scanned with OKEN Scanner

stoc cu acid sulfuric 50%, în proporție de 2,5 : 100. 6. Clorură ferică, 75% 7. Soluție standard stoc. Se cîntărește un balon cotat de 25 ml conținînd aproximativ 10 ml alcool etilic. Se adaugă aproximativ 0,05 g prometrin purificat și se recîntărește. Se aduce la semn cu alcool etilic. Din diferența celor două cîntăriri se obține concentrația de prometrin în g/ml ; 8. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic, astfel încît să se obțină o soluție cu 100 μg prometrin/1 ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră aerul cu un debit de 15 litri/minut prin hîrtie AFA montată într-o pîlnie Palmer. Cantitatea de aer recoltat se stabilește în funcție de gradul de poluare a locului de muncă analizat.

Modul de lucru

Se scoate hîrtia AFA din pîlnia Palmer, se spală într-o capsulă cu 3 ml alcool etilic și se re'a de două ori cu cîte 1 ml alcool etilic. Se lasă în repaus 15 minute, agitînd periodic, apoi se transferă soluția într-un microimpinger. Acesta este introdus într-o baie de apă cu posibilitate de termostatare la 74°C. Se adaugă 10 ml acid sulfuric 40%, închizîndu-se imediat microimpingerul, pentru a evita pierderile în metilmercaptan. Se racordează microimpingerul la o sursă de aer comprimat, reglînd debitul de aer la 0,2 litri/minut, astfel încît barbotarea să se facă cu o bulă/secundă. Prin încălzire la 74°C timp de 4 ore, prometrinul eliberează metilmercaptan, care este captat într-o eprubetă gradată conținînd 12,5 ml acetat de mercur. Se completează volumul eprubetei la 20 ml cu acetat de mercur, se adaugă 0,6 ml N-N-dimetil-p. fenilendiamină soluție de lucru și 4 picături clorură ferică 75%. Se citește extincția, după 30 minute, la spectrofotometru, la $\lambda = 500$ nm, în cuvă de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 100 și 500 μg prometrin (1—5 ml soluție standard de lucru, completați la 5 ml alcool etilic și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a prometrinului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg prometrin la m^3 aer :

$$\text{mg prometrin/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația de prometrin, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observații

1. Metoda nu este specifică, deoarece interferează mercaptanii și hidrogenul sulfurat. 2. Pentru a se obține prometrin substanță activă purificată (pentru prepararea soluției standard) se procedează astfel : se tratează 50 g prometrin tehnic cu 5 g cărbune activ pulbere și 250 ml n-peptan. Se lasă în repaus o oră, agitînd periodic. Se filtrează, prin filtru bandă albastră, într-o capsulă și se evaporă n. pentanul. Reziduul este prometrin purificat.

2. *Metoda spectrofotometrică în U.V. (din reziduuri în produse alimentare)*

Principiu

Atrazin și prometrin se extrag, se purifică și se hidrolizează cu acid sulfuric. Se măsoară extincția atrazinului și prometrinului hidrolizați la lungimile de undă 240, 225 și 255 nm.

Sensibilitatea metodei este de 25 μg atrazin sau prometrin/100 g probă.

Reactivi

1. Metanol (proaspăt distilat). 2. Carbonat de sodiu 10% 3. Eter etilic (proaspăt distilat). 4. Hidroxid de sodiu 35% 5. Celit 545. 6. Acid sulfuric 3 : 1 (g/v). 7. Acid sulfuric N. 8. Soluție standard stoc de atrazin. Se cîntăresc 0,0500 g atrazin (pt. 173—175°C) și se aduc cu metanol la 100 ml (1 ml = = 0,5 mg). 9. Soluție standard de lucru de atrazin. Se diluează soluția standard stoc cu metanol în proporție de 2 : 100 (1 ml = 10 μg atrazin). 10. Soluție standard stoc de prometrin. Se cîntăresc 0,0500 g prometrin(pt.118—120°C și se aduc la 100 ml cu metanol (1 ml = 0,5 mg). 11. Soluție standard de lucru de prometrin. Se diluează soluția standard stoc cu metanol, în proporție de 2 : 100 (1 ml = 10 μg prometrin).

Modul de lucru

Determinarea reziduurilor de atrazin sau de prometrin este identică, cu excepția fazei de hidroliză.

Pregătirea probei : se obține o probă omogenă din legume (cartofi) sau fructe (mere) curățite de coaje și rase prin răzătoare fină din plastic.

Extracția : o cantitate de probă de 200 g se omogenizează cu aproximativ 630 ml metanol într-un flacon Erlenmeyer, astfel ca în final volumul total să fie de 800 ml (se notează pe flacon acest volum). Se agită și se lasă 24 ore. Se agită din nou și se filtrează printr-o pîlnie Büchner prevăzută cu hîrtie de filtru cantitativă. Se iau 400 ml din filtrat (corespunzător la 100 g probă) și se evaporă la evaporatorul rotativ, la maximum 50°C, pînă la un volum de aproximativ 50 ml.

Purificarea : la restul apos din vasul evaporatorului se adaugă 5 ml Na_2CO_3 (în porțiuni de cîte 2 ml, sub agitare) și 50 ml eter etilic, pentru precipitarea proteinelor, precum și pentru dizolvarea grăsimilor și a cerurilor. Se agită 2 minute, se lasă în repaus 1 minut, și se trece, prin decantare, stratul eteric într-o pîlnie de separare de 250 ml. Soluția din evaporator se tratează din nou, de două ori, cu cîte 50 ml eter și se repetă operațiile de agitare și repaus, necesar separării fazelor. Se reunesc straturile eterice în aceeași pîlnie de separare. Soluția rămasă în evaporator se tratează cu 20 ml apă și 50 ml eter, trecînd tot lichidul într-o pîlnie de separare de 100 ml. Se agită și, după separarea fazelor, faza apoasă se îndepărtează, iar faza eterică se trece în pîlnia de separare de 250 ml, peste care se adaugă 1 ml NaOH. și se agită. Pentru separarea săpunurilor formate se adaugă 20 ml apă și se agită aproximativ 5 secunde. Se lasă în repaus 30 minute și se îndepărtează faza apoasă inferioară. Urmele de picături de săpunuri rămase încă în soluția eterică, se filtrează printr-o coloană cromatografică din sticlă (lungime 20 cm, diametru 15 mm) conținînd un strat de 5 cm de Celit. Se umectează coloana cu eter pînă ce, deasupra stratului de Celit, rămîne un strat eteric de aproximativ 1 cm. Se trece extractul eteric prin coloană, spălînd apoi coloana cu

Scanned with OKEN Scanner

eter. Se colectează extractul eteric și cel de spălare în vasul evaporatorului rotativ și se evaporă la sec la maximum 30°C.

Hidroliza. a) *Hidroliza atrazinului :* reziduul din evaporator se trece cantitativ, cu 10—15 ml eter, într-o pîlnie de separare de 100 ml. (Este de menționat că, înainte de folosire, eterul se spală de două ori cu cîte 10—15 ml apă într-o pîlnie de separare de 100 ml, se agită 1 minut, se lasă în repaus 30 secunde și se îndepărtează faza apoasă.) În pîlnia de separare, la reziduul și eterul etilic, se adaugă 1 ml acid sulfuric 3 : 1, se agită 30 secunde și se lasă în repaus 30 minute. Se repetă agitarea și lăsarea în repaus încă de trei ori. Se adaugă 9 ml apă și se agită energic, cînd cationul atrazinului hidrolizat trece în faza apoasă. După separarea fazelor, se trece o parte din faza apoasă în cuva spectrofotometrului. În paralel se face determinarea martor cu reactivii folosiți la hidroliza atrazinului, în aceleași condiții cu proba. b) *Hidroliza prometrinului :* reziduul din evaporator se tratează cu 10 ml acid sulfuric 3 : 1. Vasul se închide cu dop cu șlif și se lasă pe baia de apă la 100°C timp de 3 ore (din cînd în cînd se scoate dopul, pentru egalizarea presiunilor). După răcire, se trece soluția apoasă, într-o pîlnie de separare, de 100 ml, cu ajutorul a 10—15 ml eter. Se agită și după separarea fazelor, se trece o parte din faza apoasă în cuva spectrofotometrului. În paralel se face determinarea martor cu reactivii folosiți la hidroliza prometrinului, în aceleași condiții cu proba.

Colorimetrarea : se măsoară extincția la 240 nm, față de apă. Pe aceeași probă, se măsoară extincțiile la 225 și 255 nm, necesare pentru corecția de fond. Valorile extincției la 225 nm și 255 nm se scad din valoarea extincției măsurate la 240 nm. Din extincțiile măsurate, se află extincția dată de atrazin sau prometrin din probă :

$$\text{Extincția atrazinului sau prometrinului} = E_{240} - \frac{E_{225} + E_{255}}{2}$$

Se procedează în același mod cu soluția obținută la determinarea probei martor. Din valoarea extincției probei de analizat se scade valoarea extincției determinării martor. Se raportează apoi la curba etalon, obținînd concentrația C de atrazin sau prometrin în μg, corespunzător extincțiilor rezultate.

Curba de etalonare se întocmește între 5 și 150 μg atrazin sau prometrin, astfel : în 8 pîlnii de separare de 100 ml se introduc 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 10 ; 12 ; 15 ml soluție etalon de lucru și se completează la 15 ml cu metanol. Conținutul fiecărei pîlnii de separare se concentrează la evaporatorul rotativ pînă la sec, la maximum 30°C, apoi se procedează, pentru hidroliză și colorimetrare, ca la probe.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg atrazin sau prometrin la kg produs analizat :

$$\text{mg atrazin (prometrin)/kg produs analizat} = 2\,\frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația atrazinului (prometrinului) în μg ;
A = masa produsului de analizat luată în lucru, în g.

Observații

1. Dacă extincția probei martor este negativă, aceasta se adună la valoarea extincției probei ; de exemplu :

Valoarea extincției	E_{240}	E_{225}	E_{255}	$E_{240} - \frac{E_{225} + E_{255}}{2}$
Proba martor	0,029	0,048	0,024	0,007
Proba de atrazin sau prometrin	1,100	0,410	0,120	0,835

Extincțiile date de atrazin sau prometrin = 0,835 — (—0,007) = = 0,835 + 0,007 = 0,842.

Se citește pe curba etalon conținutul de atrazin sau prometrin corespunzător extincției de 0,842.

2. Se efectuează două determinări, în paralel, din aceeași probă de analizat. Dacă condițiile de repetabilitate sînt îndeplinite (diferența nu trebuie să depășească 0,1 mg/1 000 g probă), se ia ca rezultat media aritmetică a celor două determinări.

3. *Metoda gazcromatografică (din reziduuri în produse alimentare și din apă)*

Principiu

Atrazin și prometrin sînt determinați gazcromatografic, folosind un detector specific pentru compușii cu azot și fosfor (N.P.S.D.). Determinarea se efectuează după extragerea reziduurilor din compusul de analizat și purificarea prealabilă a extractului. Metoda descrisă se referă la determinarea reziduurilor de atrazin și prometrin din legume, fructe și din apă.

Reactivi

1. Metanol ; 2. Cloroform ; 3. Clorură de sodiu, soluție saturată ; 4. Benzen ; 5. Alumină activată ; 6. n-hexan.

Modul de lucru

Extragerea și purificarea. a) *Legume și fructe :* 50 g din proba de analizat (cartofi, mere) dată prin răzătoare, se lasă peste noapte la extras cu 210 ml metanol. Suspensia se filtrează prin hîrtie de filtru cutată. Se iau 50 ml extract metanolic (corespunzător la 10 g probă) și se trec într-o pîlnie de separare de 250 ml. Se diluează extractul metanolic cu 45 ml apă și 10 ml clorură de sodiu, soluție saturată. Soluția apoasă se extrage de trei ori cu cîte 70 ml cloroform. Fazele cloroformice se evaporă la sec în concentratorul rotativ pe baia de apă la 70°C și reziduul se reia în 4 ml benzen care se trec pe o coloană de alumină bazică activată grad V (15% apă). Coloana de purificare este formată dintr-un tub de sticlă cu diametrul de 1,8 cm și lungimea de 15 cm, conținînd 28 g alumină activată. Benzenul (4 ml conținînd reziduurile triazinice) se trece prin coloană la un debit scăzut (în picături), iar flaconul se spală de două ori cu cîte 4 ml benzen, care se trec prin coloană, în același mod. Se spală flaconul cu 100 ml n-hexan ; se trec prin coloană și eluentul se înlătură. Eluția atrazinei și prometrinului se face cu 100 ml amestec

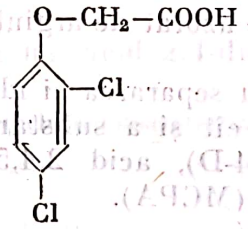
n-hexan : cloroform (2 : 3). Se colectează eluentul și se evaporă la sec în concentratorul rotativ. Reziduul se reia cu 2 ml metanol și se determină gazcromatografic. b) *Apă :* 500 ml apă se trec într-o pîlnie de separare și se extrag de trei ori cu cîte 100 ml cloroform (sau clorură de metilen). Extractele reunite se trec în concentratorul rotativ și se evaporă la sec. Reziduul se reia în 2 ml metanol și se determină gazcromatografic.

Gazcromatografiarea

Coloană : 2 m × 4 mm diametru interior, din sticlă
Umplutură : 5% OV_1 (metilsilicon) pe Gaz Chrom Q 80—100 mesh
Temperatura coloanei : 210°C
Gaz purtător : azot
Cantitatea injectată : 1 µl
Debite optime : azot, 50 ml/min ; hidrogen, 45 ml/min; aer, 250 ml/min.
Timp de retenție : atrazin, 4′5″ ; prometrin, 6′55″
Limită de detecție : atrazin, 0,125 ng ; prometrin, 0,5 ng

Evaluarea cantitativă se face prin calibrare directă, reprezentînd grafic înălțimea picurilor față de concentrația introdusă. Curba prezintă, în domeniul de linearitate, între 0,125 ng și 10 ng pentru atrazin și între 0,25 ng și 20 ng pentru prometrin. Sensibilitatea metodei : 0,025 ppm atrazin și 0,05 ppm prometrin. Recuperările pentru limita inferioară : 97% pentru atrazin și 90% pentru prometrin.

II.7.10. ACIDUL 2,4-DICLORFENOXIACETIC (2,4-D)



A. Izolare

Acidul 2,4-diclofenoxiacetic (2,4-D) se izolează din mediu acid cu solvenți organici.

a) *Izolare din urină :* se acidulează 50 ml urină la *p*H 1—3 cu acid clorhidric 10% sau acid sulfuric 10%. Se extrag într-o pîlnie de separare, de două ori, cu cîte 50—100 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se filtrează printr-un filtru uscat peste sulfat de sodiu anhidru și se evaporă la sec.

b) *Izolare din produse vegetale.* 1). Se acidulează 10—20 g produs fragmentat și se extrage (în aparatul Soxhlet sau prin agitare într-o pîlnie de separare) cu etanol 96°, eter etilic sau acetonă. Extractul organic se filtrează și se evaporă la sec. 2). Se supune planta din care se determină 2,4-D, antrenării cu vapori de apă din mediu acid. 3). (v. Dozare, Metoda gazcromatografică pentru grîu și făină de grîu).

c) *Izolare din produsul tehnic (Diclordon)* (v. Cromatografie în strat subțire).

B. **Identificare**

1. *Reacție de culoare*

Se tratează reziduul cu 2—3 ml acid cromotropic 0,1% în acid sulfuric concentrat și se încălzește 15 minute într-o baie de apă la fierbere, cînd apare o colorație violetă.

2. *Cromatografie în strat subțire* (tehnica Maria Ajtay)

Se cîntăresc 2 g din produsul tehnic, Diclordon, se adaugă 25 ml apă distilată și se acidulează cu acid sulfuric diluat pînă la pH 2—3. Soluția acidă se extrage de trei ori cu cîte 50 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se purifică prin tratare cu hidroxid de sodiu 10%, iar faza alcalină, după acidulare, se extrage din nou cu eter. Operația se repetă de mai multe ori. Extractul final se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru. Filtratul se evaporă la sec. Se reia reziduul cu etanol; această soluție servește pentru determinarea cromatografică.

Ca suport se folosesc plăci (silicagel cu adaus de 13% gips grosime de 0,250 mm) activate 20 minute la 110°. Se spotează 50 micrograme din extractul alcoolic din Diclordon, precum și substanțe pure ca substanțe de referință.

Sistemele de migrare optime sînt: benzen : acid acetic glacial : eter de petrol (15 : 10 : 75) și toluen : acid acetic glacial : eter de petrol (15 : 10 : 75). Plăcile sînt în prealabil impregnate cu un sistem de eter de petrol : acid acetic glacial (90 : 10), apoi uscate cu un curent de aer cald. Timpul de migrare este de 90 minute.

Revelarea se realizează prin: 1) expunere timp de 10 minute la vapori de clor, îndepărtarea completă a urmelor de clor și pulverizare cu o soluție formată din 50 ml iodură de potasiu 1%, 30 ml soluție amidon 3% și 20 ml etanol. Apar spoturi colorate în albastru pe fond alb. 2) pulverizare cu o soluție de dicromat de potasiu 0,1 M acidulat cu acid acetic concentrat, uscare la aer și tratare cu o soluție de azotat de argint 0,1 M. Apar spoturi colorate în galben pe fond roșcat.

Metoda se pretează pentru separarea și identificarea, atît a extractelor obținute din produse tehnice, cît și a substanțelor pure clorfenoxiacetice: acid 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D), acid 2,4,5-triclorfenoxiacetic (2,4,5-T), acid 4-clor-2-metil-fenoxiacetic (MCPA).

3. *Spectrofotometrie în U.V.*

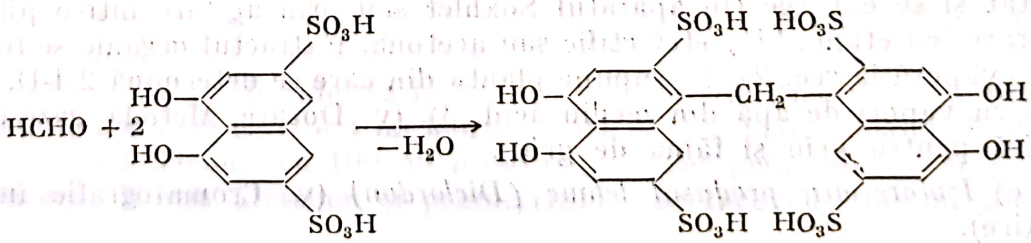
Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic prezintă, atît în soluții acide, cît și alcaline, un maximum de absorbție la 282 nm.

C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică cu acid cromotropic*

Principiu

Acidul 2,4-diclorfenioxiacetic, la cald și în prezența acidului sulfuric, eliberează formaldehidă, care cu acidul cromotropic formează un compus violet, colorimetrabil:



a) *Aer*

Reactivi

1. Alcool etilic 50°. 2. Acid cromotropic 0,15% în metanol (se păstrează în sticle brune, bine închise). 3. Acid sulfuric concentrat. 4. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g acid 2,4-diclorfenoxiacetic și se aduc la 100 ml cu metanol (1 ml = 1 mg). 5. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu apă distilată, în proporție de 1 : 50 (1 ml = 20 μg 2,4-D).

Recoltarea probelor

Se aspiră 5—10 litri aer cu un debit de 1 litru/minut, prin două microabsorbitoare conținînd cîte 5 ml alcool 50°. În timpul recoltării, microabsorbitoarele sînt menținute într-un amestec refrigerent.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ probele recoltate în capsule, reluînd de două ori cu cîte 1 ml apă distilată. Se adaugă cîte 5 ml acid cromotropic și se evaporă la sec pe baia de apă la fierbere. Reziduul se reia cu 5 ml acid sulfuric concentrat. Se introduc capsulele la etuvă la 135°C, menținîndu-se 20 minute. După răcire, se adaugă treptat, cu atenție, 20—30 ml apă. Se amestecă cu o baghetă și se filtrează în baloane cotate de 50 ml. Se spală capsulele și filtrele de 2 ori cu cîte 3 ml apă, apoi se aduce la semn cu apă distilată. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 552$ nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba etalon se întocmește între 20 și 100 μg 2,4-D (1—5 ml soluție standard de lucru, completați la 5 ml cu apă și prelucrați în condițiile probelor). Valoarea extincției probelor se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a acidului 2,4-diclorfenoxiacetic, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acid 2,4-diclorfenoxiacetic la m³ aer :

$$\text{mg acid 2,4-diclorfenoxiacetic/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația 2,4-D, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

b) *Produse biologice, produse alimentare*

Reactivi

1. Acid cromotropic 0,1% în acid sulfuric concentrat. 2. Acid sulfuric 1 : 1 (v/v). 3. Soluție standard stoc. Se cîntăresc 0,1000 g acid 2,4-diclorfenoxiacetic și se aduc la 100 ml cu metanol (1 ml = 1 mg). 4. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu metanol în proporție de 1 : 10 (1 ml = 100 μg 2,4-D).

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea cu solvenți organici este tratat cu 5 ml acid cromotropic. Se trece cantitativ lichidul într-o eprubetă gradată și se încălzește în baia de apă la fierbere timp de 15 minute. Se răcește și se aduce volumul la 10 ml cu apă. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 570$ nm, în cuva de 1 cm, față de acid sulfuric 1 : 1.

Curba etalon se întocmește între 20 și 100 μg 2,4-D (0,2—1 ml soluție standard de lucru completați la 1 ml cu metanol și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a acidului 2,4-diclorfenoxiacetic, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg acid 2,4-diclorfenoxiacetic la 100 ml sînge și la 1 000 ml (g) urină sau produs alimentar :

$$\text{mg 2,4-D/100 ml sînge} = \frac{C}{10 \cdot A}$$

$$\text{mg 2,4-D/1 000 ml (g) urină, produs alimentar} = \frac{C}{A}$$

în care :

C = concentrația acidului 2,4-diclorfenoxiacetic, în μg ;

V = volumul (masa) de produs biologic sau alimentar luat în lucru, în ml (g).

2. *Metoda spectrofotometrică cu 4-aminoantipirină*

Principiu

Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic este tratat cu piridină clorhidrică, în scopul scindării legăturii sale eterice. 2,4-Diclorfenolul rezultat formează cu 4-aminoantipirina, în mediu alcalin și în prezența unui oxidant, un compus de culoare roșie, colorimetrabil.

Reactivi

1. Piridină clorhidrică. 2. Acid clorhidric concentrat. 3. Amoniac N 4. Eter de petrol. 5. Eter etilic. 6. Amoniac 5%. 7. Soluție de 4-aminoantipirină 1% în tampon fosfat *p*H = 9. 8. Fericianură de potasiu 1%. 9. Soluție standard. Se cîntăresc 0,1000 g acid 2,4-diclofenoxiacetic și se aduc la 200 ml cu metanol. 1 ml = 500 μg.

Modul de lucru

Reziduul obținut la extragerea cu solvenți organici este tratat cu 10 ml piridină și încălzit la 210°C (pe baia de nisip) timp de o oră. Se răcește și se adaugă 10 ml apă și 10 ml acid clorhidric concentrat. Se aduce cantitativ lichidul într-un balon de distilare, reluînd cu cîteva porțiuni de apă — în total 150 ml apă. Se distilă, culegînd distilatul în 10 ml amoniac N. Se extrage distilatul de două ori cu cîte 25 ml eter de petrol. Se îndepărtează fazele de eter de petrol (conținînd impuritățile) și se tratează fazele reunite apoase cu 5 ml acid clorhidric, apoi se extrag de două ori cu cîte 50 ml eter etilic. Fazele eterice reunite se spală cu 25 ml apă, apoi se extrag de două ori cu cîte 10 ml amoniac 5%. Soluțiile apoase reunite sînt trecute într-un balon cotat de 25 ml. Se aduce la semn cu apă. La 5 ml din această soluție se adaugă 1 ml soluție 4-aminoantipirină și 1 ml soluție fericianură. Se citește extincția la spectrofotometru, la λ = 515 nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 50 și 250 μg 2,4-D (0,1—0,5 ml soluție standard completați la 0,5 ml cu metanol și prelucrați în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon,

apoi se înmulțește cu 5 — deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă — obținîndu-se concentrația C a 2,4-D, în μg, în probă.

Calcul

(v. metoda precedentă).

Interpretarea rezultatelor

Doza medie letală de acid 2,4-diclorfenoxiacetic, la om, este apreciată la 28 g. Într-un caz de ingerare voluntară de 7 g 2,4-D, s-a găsit o concentrație plasmatică inițială de 400 mg/litru sînge, iar în alt caz, nemortal, de ingerare a unei supradoze de 2,4-D, s-au decelat 1 031 mg/litru sînge și 1 900 mg/l urină. În 5 cazuri fatale după ingerare de supradoze de 2,4-D, s-au găsit următoarele valori medii și extreme : 416 (58—826) mg/litru sînge, 255 (111—390) mg/litru urină, 186(21—409) mg/kg ficat.

3. *Metoda gazcromatografică*

Principiu

Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic este determinat gazcromatografic sub formă de metoxietilester, folosind detectorul cu captură de electroni. Determinarea se efectuează pe extractul purificat al probei metilate, astfel : reziduurile de 2,4-D se extrag cu un amestec de acetonitril 35% — apă, reziduul uscat al probei se esterifică cu 2-metoxietanol (metilcelosolv) saturat la rece cu acid clorhidric gazos și se purifică prin trecere pe o coloană de Florizil. Metoda descrisă se pretează pentru determinarea reziduurilor de 2,4-D din grîu și făină de grîu.

Reactivi

1. Acetonitril 35% — apă. 2. Clorură de sodiu. 3. Hidroxid de sodiu 3%. 4. Cloroform. 5. Acid sulfuric 10%. 6. Izooctan. 7. 2-metoxietanol saturat la rece cu acid clorhidric gazos. 8. Hexan. 9. Fosfat bipotasiu, soluție 0,2 M. 10. Florizil 60—100 mesh. 11. Sulfat de sodiu anhidru. 12. Eter etilic proaspăt distilat. 13. Izooctan.

Modul de lucru

Extragerea : 50 g boabe de grîu sau făină se introduc într-un omogenizator și se omogenizează cu 175 ml acetonitril 35% — apă, timp de 10 minute. Se filtrează prin hîrtie de filtru și se iau în lucru 140 ml, corespunzător la 40 g probă. Se evaporă acetonitrilul în concentratorul rotativ pe baia de apă la 65°C. La faza apoasă rămasă se adaugă 1 g NaCl și 25 ml NaOH. Se trece proba într-o pîlnie de separare de 250 ml, folosind cîteva porțiuni de apă. Se spală flaconul cu aproximativ 40 ml cloroform, care se adaugă în pîlnie. Se agită puternic, se lasă să se separe și se înlătură faza cloroformică (poate fi tulbure). Se acidulează cu 25 ml acid sulfuric 10% și se extrage cu 50 ; 25 ; 25 ml cloroform. Se adaugă 0,5 ml izooctan (pentru prevenirea pierderilor prin evaporare) și se aduce la sec.

Esterificarea : reziduul cloroformic este reluat cu 1 ml 2-metoxietanol saturat la rece cu acid clorhidric gazos și se menține pe baia de apă la fierbere, într-un flacon cu dop. Se răcește amestecul, se adaugă 50 ml hexan și se trece într-o pîlnie de separare. Flaconul se spală de două ori cu cîte 25 ml fosfat dipotasic 0,2 M, care se trece în pîlnie de separare și, după extragere, faza apoasă se înlătură. Hexanul se extrage de 6 ori cu cîte 50 ml fosfat dipotasic 0,2 M și apoi de 3—4 ori cu apă.

Scanned with OKEN Scanner

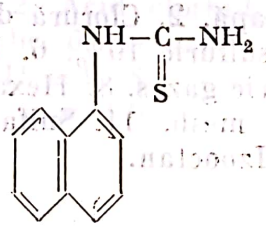
Purificarea pe Florizil : fracțiunea de hexan se trece într-o coloană cromatografică cu diametrul de 20 mm, care conține aproximativ 10 cm Florizil activat o oră la 660°C, acoperit cu un strat de 2 cm sulfat de sodiu anhidru. Esterii sînt eluați cu 100 ml eter etilic. Se adaugă 50 ml izooctan și se evaporă la sec. Se aduce la volum final cu izooctan sau hexan și se gazcromatografiază.

Gazcromatografierea

Coloană : 2 m × 3 mm diametru interior, din sticlă
Umplutură : 5% OV_1 pe Gaz Chrom Q 80-100 mesh
Detector cu captură de electroni operat în regim pulsant
Potențial de excitare 50 V ; perioadă, 30 μs
Interval între pulsuri, 1 μs
Temperatura coloanei 200°C
Temperatura injectorului 250°C
Temperatura detectorului 275°C
Gaz purtător : azot P = 2,1
Tim de retenție : 5 minute, 20 secunde
Limită de detecție : 0,5 ng
Cantitate injectată : 1 μl

Evaluarea cantitativă se face prin calibrare directă față de o curbă de calibrare obținută în același mod (fără a urma însă faza de purificare) și ținînd seama de diluție.

II.7.11. ALFA-NAFTILTIOUREEA (ANTU)



A. **Izolare**

Alfa-naftiltiouree (ANTU) se izolează din mediu acid cu solvenți organici.

a) *Izolare din corp delict :* 1) *Pulbere, semințe tratate :* se extrag 1—5 g produs cu 25 ml alcool etilic de 95° fierbinte. Se răcește și se filtrează. Extractul alcoolic este evaporat la sec pe baia de apă. 2. *Momeli* (ANTU înglobat în produse alimentare grase) : se triturează o cantitate de produs cu sulfat de sodiu anhidru, pînă la obținerea unei mase pulverulente. Se introduce această masă într-o alonjă de sticlă și se degresează cu eter de petrol, care se îndepărtează. Urmele de eter de petrol rămase în alonjă sînt eliminate cu un curent de aer. Se extrage masa din alonjă cu cloroform. Extractul cloroformic este evaporat la sec pe baia de apă.

b) *Izolare din organe (conținut stomacal).* 1. Organele fin divizate (sau conținutul stomacal) se tratează cu alcool etilic de 90° pe baia de apă, cu refrigerent ascedent. Se filtrează și se evaporă filtratul la sec. Se extrage reziduul cu cloroform, în care trec grăsimile și ANTU. Se evaporă cloroformul. Reziduul se saponifică cu hidroxid de potasiu soluție alcoolică, apoi se diluează cu apă, se acidulează și se extrage cu eter etilic. Extractul etilic se spală de 2—3 ori cu hidroxid de sodiu soluție normală pentru îndepărtarea acizilor grași, apoi

Scanned with OKEN Scanner

se usucă pe sulfat de sodiu anhidru și se evaporă la sec. Reziduul conține ANTU aproape pur. 2. În mersul general al analizei toxicologice după metoda Stas-Otto-Ogier, ANTU se regăsește în eterul acid.

B. **Identificare**

1. *Reacții de precipitare și de culoare*

a) Reziduul de la evaporarea solventului, reluat cu cîțiva milimetri de hidroxid de sodiu, este încălzit pe baia de apă, cînd ANTU este descompus cu eliberare de alfa-naftilamină. Aceasta se identifică prin diazotare și cuplare (v. Amine aromatice).

b) Reziduul este reluat cu cîteva picături de acid sulfuric concentrat, apoi se adaugă :

— o picătură de clorură ferică 5% : culoare violetă

— o picătură de formol 40% ; culoare verde ;

— un cristal de dicromat de potasiu : la trasarea de linii cu o baghetă în fundul capsulei, în urma baghetei rămîn striuri violete (ca la stricnină).

c) Reziduul reluat cu cîțiva mililitri de cloroform este agitat cu cîteva picături de apă de brom. La alcalinizare cu NaOH 4 N (în ușor exces), faza cloroformică se colorează în albastru-violet, iar coloratia presistă chiar la agitare cu H_2SO_4 60%.

d) ANTU în soluție alcoolică sau apoasă formează precipitate cu :

— $CuSO_4$: precipitat alb floconos, nu își schimbă culoarea la încălzire ;

— $HgCl_2$: precipitat alb floconos, se îngălbenește la încălzire ;

— $AgNO_3$: precipitat alb, trece în negru-brun la încălzire ;

— $Bi(NO_3)_2$: precipitat galben, trece în galben-brun la încălzire ;

— acid teluric, la încălzire : precipitat galben pînă la roșu ;

— acetat de plumb, soluție fierbinte : precipitat negru.

e) ANTU încălzit cu HNO_3 concentrat dă o coloratie roșie-roz ;

f) ANTU încălzit la fierbere cu KOH soluție alcoolică, formează, la adaos de p. nitroanilină diazotată cu un mic exces de acid clorhidric, un precipitat roșu floconos. Reacția este specifică și sensibilă.

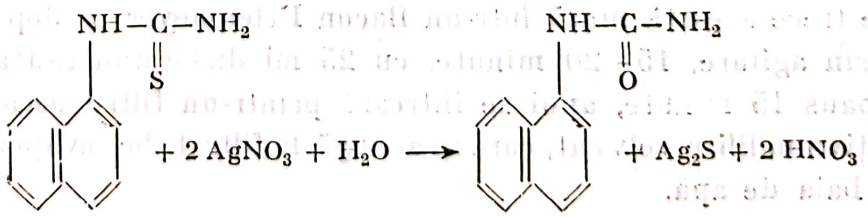
g) ANTU dă următoarele precipitate (coloratii) cu reactivii generali ai alcaloizilor (v. Alcaloizi) : reactiv Wagner, precipitat brun-închis; reactiv Mayer, precipitat alb ; reactiv Mandelin, coloratie violetă ; reactiv Marquis, coloratie verde ; reactiv Fröhde, coloratie violetă, care trece în roșu, apoi în verde și, în final, în albastru.

C. **Dozare**

1. *Metoda argentometrică (tehnica Ionaszik și Crișan)*

Principiu

Alfa-naftiltioureea reacționează cu azotatul de argint cu formare de alfa-naftiluree, sulfură de argint și acid azotic. După îndepărtarea excesului de azotat de argint cu clorură de sodiu, acidul azotic este dozat volumetric :



Reactivi

1. Alcool absolut ; 2. Azotat de argint 0,1 N ; 3. Clorură de sodiu 25% ; 4. Hidroxid de sodiu 0,1 N ; 5. Metiloranj, 0,1% (soluție apoasă).

Modul de lucru

Se cîntăresc 0,1500 g produs necondiționat și se aduc într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml cu 25 ml alcool absolut. Se încălzește la reflux pînă la dizolvare. Se adaugă, în soluția caldă, în porțiuni mici și sub agitare continuă, 25 ml soluție de azotat de argint 0,1 N. Se răcește la jet de apă, agitînd, pînă la formarea sulfurii de argint. Se adaugă 100 ml NaCl 25%, cînd tot precipitatul se depune rapid în fundul flaconului. Se filtrează și se spală precipitatul de cîteva ori cu apă, adăugînd apele de spălare la filtrat. Se titrează cu NaOH 0,1 N în prezența metiloranjului, pînă la culoarea galbenă.

Calcul

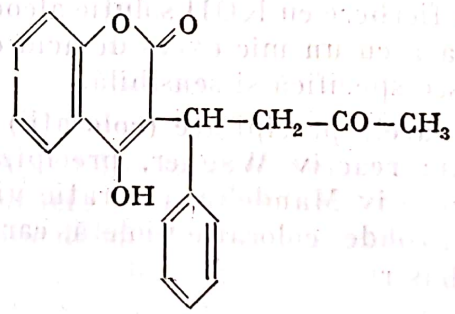
Rezultatele se exprimă în g ANTU la 100 g produs de analizat

$$\text{g ANTU/100 g produs de analizat} = 1{,}011\,\frac{N}{A}$$

în care :

N = hidroxid de sodiu 0,1 N folosit la titrare, în ml ;
A = produs de analizat luat în lucru, în g ;
1,011 = factor de transformare $AgNO_3$ 0,1 N/ANTU.

II.7.12. WARFARINA



A. Izolare

Warfarina se izolează din mediu acid cu solvenți organici.

a) *Izolare din produse biologice :* se triturează într-un mojar, 5 g (ml) produs biologic (organe, sînge, urină) cu puțin nisip purificat, apoi se adaugă 1 g acid tartric și sulfat de sodiu anhidru pînă la obținerea unei mase pulverulente. Se trece această masă într-un flacon Erlenmeyer cu dop rodat și se extrage, prin agitare, 15—20 minute, cu 25 ml dicloretan sau acetonă. Se lasă în repaus 15 minute, apoi se filtrează printr-un filtru uscat. Se spală filtru cu cîțiva mililitri solvent, care se adaugă la filtrat. Se evaporă filtratul la sec, pe baia de apă.

Scanned with OKEN Scanner

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) Reziduul este tratat cu reactiv Liebermann, cînd apare o culoare portocalie.

Reactiv Liebermann: 10 g nitrat de potasiu în 100 ml acid sulfuric concentrat.

b) Reziduul se dizolvă în 1—2 ml NaOH 10%, se încălzește cîteva minute pe baia de apă, se răcește și se adaugă cîteva picături de soluție Lugol (soluție apoasă iod-iodură), cînd se dezvoltă un miros caracteristic de iodoform.

c) Reziduul se dizolvă în 1—2 ml soluție tampon fosfat (pH 8), se adaugă 0,5 ml soluție de 4-aminoantipirină 1% și 0,5 ml soluție de fericianură de potasiu 3%, cînd apare o culoare roșie.

d) *Reacția Meltzer* (reacția de nitrare): reziduul se tratează cu 1—2 m amestec sulfonitric (1 volum acid sulfuric concentrat și 1 volum acid azotic umans), se încălzește 15 minute pe baia de apă la fierbere, se răcește și se alcalinizează cu NaOH 20%, cînd apare o culoare galbenă.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se dizolvă reziduul în 0,2—0,5 ml cloroform sau etanol și se spotează pe cromatoplacă în paralel cu un martor.

Sistemul de migrare este: eter de petrol : anhidridă acetică : cloroform : etanol (10 : 5 : 7 : 1).

Revelarea se realizează prin pulverizare cu soluție de fericianură de potasiu (2 volume) și soluție de clorură ferică 1% (1 volum). Ambele soluții se prepară în etanol 50%, iar amestecul se face extemporaneu.

3. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) U.V. (maxime)

Warfarina în NaOH 0,01 N, 308

b) I.R. (în KBr)

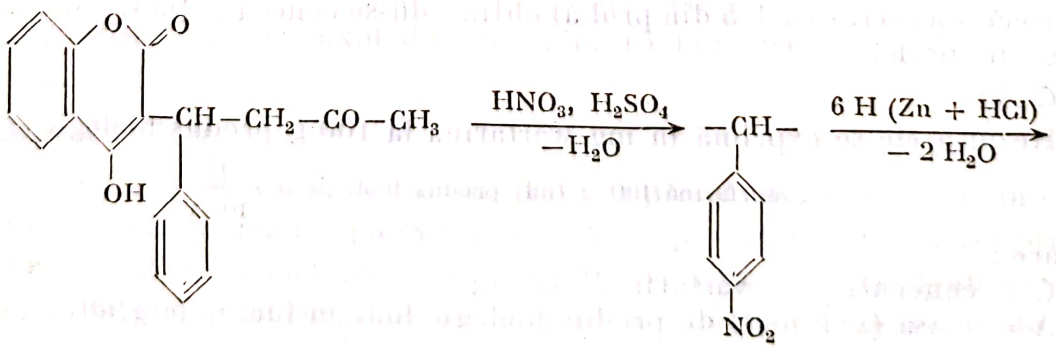
Warfarina-Na: A(1517), B(1599), C(1640).

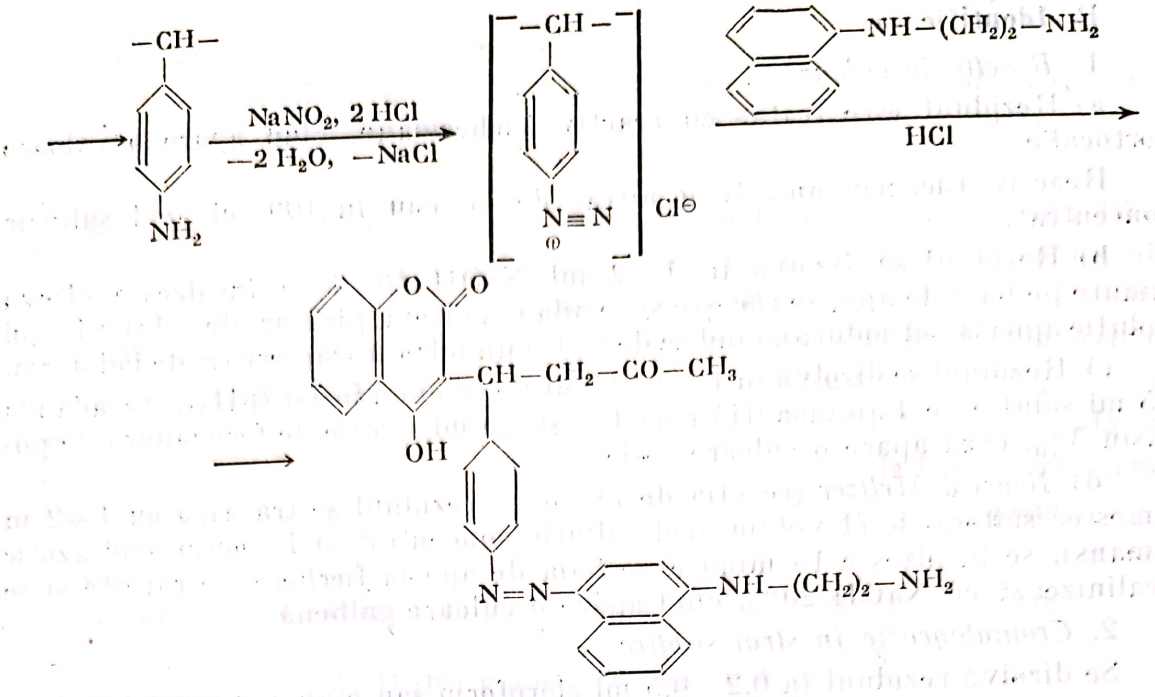
C. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică*

Principiu

Warfarina se nitrează la nucleul benzenic, apoi, succesiv, se reduce, se diazotează, iar clorura de diazoniu se cuplează cu N-naftil-etilendiamina (NED), obținîndu-se un azoderivat, violet, colorimetrabil:





Reactivi

1. Amestec sulfonitric (acid sulfuric concentrat, 1 volum, acid azotic fumans, 1 volum); 2. Eter etilic; 3. Acid clorhidric 10%; 4. Zinc pulbere; 5. Nitrit de sodiu 0,1%; 6. Uree 10%; 7. N-naftil-etilendiamină, 1%; 8. Soluție standard. Se cîntăresc 0,1000 g warfarină și se aduce la 200 ml cu dicloretan sau acetonă (1 ml = 0,5 mg = 500 μg warfarină).

Modul de lucru

Se tratează reziduul într-o capsulă cu 5 ml amestec sulfonitric, se încălzește 15 minute pe baia de apă la 60—80°C și se adaugă 20 ml apă. Se transvazează cantitativ într-o pîlnie de separare și se extrage cu 50 ml eter. Se repetă extragerea cu 50 ml eter. Extractele reunite se filtrează printr-un filtru uscat într-o capsulă și se evaporă la sec pe baia de apă. Reziduul se dizolvă în 10 ml HCl 10%, se adaugă 0,20 g zinc pulbere și se încălzește pe baia de apă la fierbere. Se lasă în repaus 15 minute, apoi se filtrează într-un balon cotat de 25 ml aducîndu-se la semn cu apă. Se iau 5 ml soluție, se adaugă 0,2 ml soluție nitrit, de sodiu și, după 10 minute, 2 ml soluție uree. Se agită și după 10 minute se adaugă 1 ml NED. Se citește extincția după 10 minute la spectrofotometru, la $\lambda = 550$ nm, în cuva de 1 cm, față de un blanc al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmește între 25 și 250 μg warfarină (se iau 0,05—0,5 ml soluție standard și se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulțește cu 5 (deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă) obținîndu-se concentrația C a warfarinei, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg warfarină la 100 g produs biologic:

$$\text{mg warfarină/100 g (ml) produs biologic} = \frac{C}{10\ A}$$

în care:

C = concentrația warfarinei, în μg;

A = masa (volumul) de produs biologic luat în lucru, în g(ml).

II.8. ALTE DETERMINĂRI

II.8.1. MICOTOXINELE

1. *Metodă rapidă cromatografică în strat subțire pentru evidențierea aflatoxinelor (după Preda)*

Aflatoxinele se extrag din produsul de analizat (alimente, furaje) prin agitare cu un volum dublu de amestec metanol : apă (1 : 1). Extractul metanolic se delipidează — dacă este cazul — cu eter de petrol și apoi se extrage cu cloroform. Extractul cloroformic se trece peste sulfat de sodiu anhidru pentru îndepărtarea urmelor de apă și apoi se distilă la presiune redusă cu curent de azot, la sec. Reziduul se reia cu cloroform și se spotează pe cromatoplacă. Sistemele de migrare sînt : cloroform : metanol (95 : 5) sau cloroform : acetat de etil (90 : 10). Prin expunere la lampa de U.V. (360 nm) se observă o fluorescență albastră (pentru aflatoxinele B) care virează în verde după pulverizare cu acid sulfuric 20% și dispare după pulverizare cu hidroxid de sodiu 10%.

2. *Metoda rapidă cromatografică pe coloană pentru determinarea semicantitativă a aflatoxinelor (tehnica Holaday, după Institutul de Igienă Iași)*

Principiu

Aflatoxinele se separă prin cromatografie pe coloană și se determină prin fluorescența manifestată în U.V.

Reactivi și materiale

1. Amestec metanol : apă (80 : 20, v/v). 2. Soluție clorură de sodiu-acetat de zinc-acid acetic glacial. Se aduc 60 g NaCl, 20 g acetat de zinc și 1,5 ml acid acetic glacial în 400 ml apă. 3. Benzen. 4. Soluție de spălare, hexan : acetonă (80 : 20, v/v). 5. Florisil, 100—200 mesh. 6. Oxid de aluminiu neutru 100—200 mesh. 7. Lampă de U.V. (360—366 nm). 8. Minicoloane cromatografice. Se pot confecționa dintr-un tub de pipetă Pasteur. Au lungimea de 17 cm, diametrul interior de 5—6 mm și se continuă cu o porțiune efilată introdusă într-un balon Kitasato, în legătură cu o trompă de vid. Prin extremitatea superioară liberă se introduc următoarele straturi : pastă de hîrtie, 6 mm, Florisil, 15 mm, oxid de aluminiu, 15 mm, pastă de hîrtie, 4 mm (fig. 32).

Modul de lucru

Se agită timp de un minut, o cantitate de produs de analizat cu un volum dublu de soluție metanol : apă (80 : 20) (de exemplu, 100 g cereale sau produse cerealiere cu 200 ml metanol : apă, 80 : 20). Se filtrează printr-un filtru cu pori mari. Se iau 10 ml filtrat, se adaugă 10 ml soluție NaCl-acetat de zinc-

Scanned with OKEN Scanner

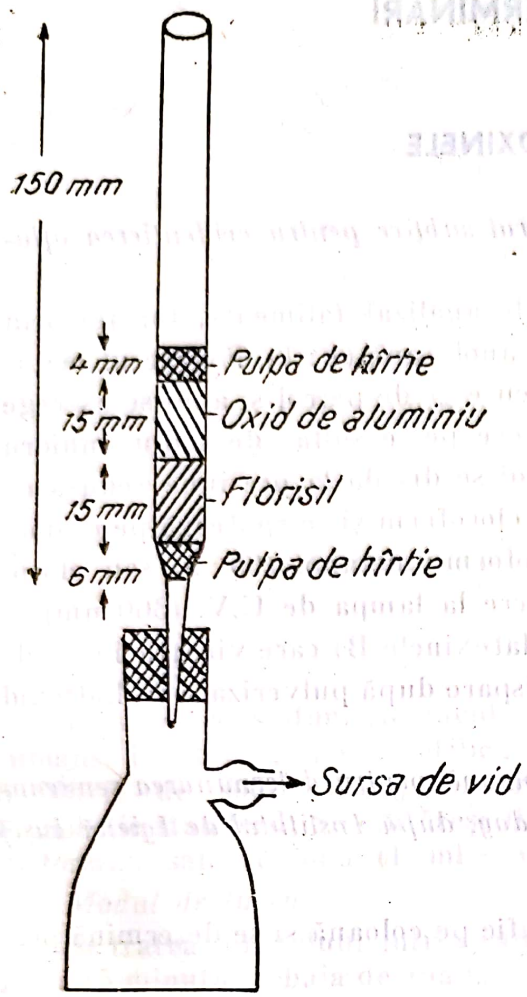


Fig. 32 — Minicoloană pentru separarea aflatoxinelor.

acid acetic glacial, se agită puternic timp de 5—10 secunde și se filtrează. Se iau, într-o eprubetă cu dop rodat, 15 ml filtrat și 3 ml benzen și se agită puternic timp de 5—10 secunde. După separarea fazelor, se iau 2 ml fază benzenică și se trec prin minicoloană. După trecerea benzenului, se spală coloana cu 5 ml soluție de spălare. Se continuă absorbția la vid încă 2 minute (sau pînă ce toată soluția de spălare s-a evaporat). Se scoate minicoloana din suport și se observă în lumina U.V. O bandă cu fluorescență albastră la interferența straturilor de florisil și oxid de aluminiu indică o cantitate sub 0,02 micrograme aflatoxină în probă (2,5 g produs de analizat aflat în 2 ml extract benzenic luat în lucru), ceea ce reprezintă mai puțin de 8 ppb aflatoxină.

Observații

1. Dacă se adaugă la același produs alimentar (de exemplu, cereale), însă necontaminat cu aflatoxină, cantități cunoscute de aflatoxină B_1 și G_1 — între 0,8 și 20 μg — și se prelucrează în condițiile probei, se pot aprecia vizual mărimea și intensitatea spoturilor fluorescente.

2. Metoda are avantajele de a fi rapidă și de a utiliza, ca soluție de spălare hexan, și acetonă, care îndepărtează parțial impuritățile fluorescente.

3. *Metodă cromatografică în strat subțire pentru determinarea aflatoxinei B_1 (după Preda)*

Principiu

Aflatoxina B_1 se extrage din produsul de analizat (cereale, semințe oleaginoase, brînzeturi, șroturi) cu amestec metanol : apă. Extractul metanolic este purificat cu eter de petrol, extras cu cloroform și supus cromatografiei în strat subțire bidimensionale. Spoturile fluorescente în U.V. sînt apreciate prin comparare vizuală cu spoturile standard.

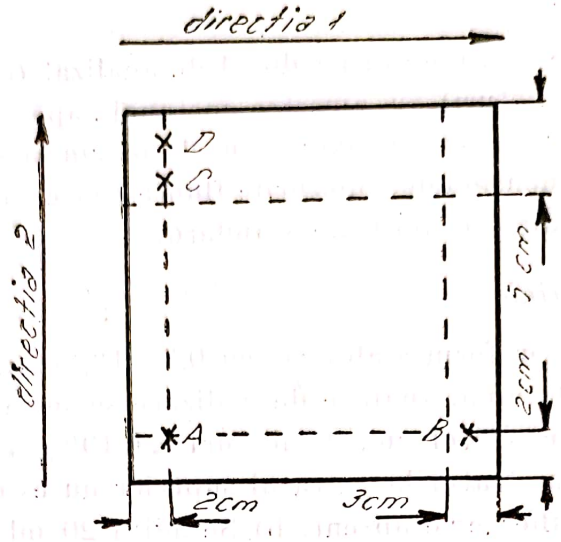
Reactivi și materiale

1. Acetonă. 2. Cloroform stabilizat cu 0,5—1% etanol 93°. Se păstrează în frigider, ferit de lumină. Înainte de utilizare se testează calitatea, astfel: a) Se adaugă, la 5 ml cloroform, 2 picături KI 10% și 1 ml amidon 0,5%. Dacă, după separarea straturilor, stratul superior nu este colorat în albastru înseamnă că clorul liber este absent. b) Se agită 20 ml cloroform cu 20 ml apă bidistilată. Faza apoasă se separă, se filtrează și i se determină pH-ul, care trebuie să fie neutru. c) Se dizolvă 0,050 g benzidină în 10 ml cloroform. Se menține la întuneric 15 minute. Dacă soluția galbenă este limpede, înseamnă că fosgenul este absent. 3. Eter de petrol, p.f. 28—40°C, cu un conținut sub 0,1% compuși aromatici exprimați în benzen. 4. Metanol. 5. Eter etilic, lipsit de peroxizi. 6. Acid sulfuric : apă (1 : 1, v/v). 7. Sulfat de sodiu anhidru. 8. Standarde de aflatoxine furnizate de către Institutul de Igienă și Sănătate Publică și Institutul de Medicină și Farmacie (toxicologie), Cluj-Napoca. Tehnica de preparare a standardelor este indicată pe ambalaj. 9. Lampă de U.V. (360 nm). Se verifică lungimea de undă cu o cromatoplacă pe care se aplică 2,5 μg aflatoxină B_1; spotul trebuie să fie clar, vizibil.

Modul de lucru

Se amestecă, timp de 2 minute, într-un pahar Berzelius, 50 g produs de analizat bine omogenizat și lipsit de apă (prin evaporare pe baia de apă) cu 100 ml metanol și 10 ml apă. Se adaugă încă 30 ml apă și se continuă omogenizarea 2 minute. Masa omogenizată se centrifughează la 2 500—3 000 rot/min. sau se filtrează printr-un material poros. Se iau, într-o pîlnie de separare de 250 ml, 70 ml supernatant sau filtrat (fără urme de ulei), se adaugă 50 ml eter de petrol, se agită un minut și, după separarea fazelor, se îndepărtează faza eterică (superioară). Se adaugă în pîlnia de separare 20 ml apă, apoi 90 ml cloroform, se agită un minut și se lasă să se separe fazele (ambele faze trebuie să fie limpezi). Se separă faza cloroformică (inferioară), se usucă pe sulfat de sodiu anhidru cîteva minute, apoi se evaporă la sec în vid sau pe baia de apă. Se dizolvă reziduul în 1 ml cloroform (reziduul se păstrează la întuneric pînă la dizolvare în cloroform).

Pe cromatoplacă (20 × 20 cm, activată o oră la 110°C) se marchează cu linii punctate limitele de oprire ale solventului, după următoarea schiță :



Se depun pe cromatoplacă spoturile : A = 20 µl probă (extract cloroformic) și B, C, D = 2,5 µl, respectiv 5 µl și 10 µl standard aflatoxină B_1 de concentrație 1 µg/ml. Cromatograma este developată în tancul, menținut, de preferință, la întuneric, cu un amestec de eter etilic : metanol : apă (94 : 4,5 : 1,5). Se eluează pînă ce solventul atinge complet linia superioară (marcată punctat în figură). Se scoate cromatoplaca din tanc și se usucă rapid (15 minute) la întuneric. Se imprimă plăcii o mișcare de rotație de 90° și se developează în direcția 2 cu un amestec de cloroform : acetonă (90 : 10). Se eluează pînă la linia de marcaj stabilită inițial. Se scoate placa din tanc și se usucă la temperatura laboratorului. Se examinează la lampa de U.V. (360 nm) la o distanță de 10 cm de sursa de lumină. Se observă fluorescența albăstruie a spoturilor de alfatoxină B_1, comparîndu-se intensitatea spotului din probă (A) cu a celor din standarde (B, C, D).

Prezența aflatoxinei B_1 din produsul de analizat este considerată „detectabilă" dacă intensitatea sa este egală sau superioară spoturilor standard. Ca verificare suplimentară a localizării și a aspectului spotului de aflatoxină B_1 din probă, se spotează pe o a doua placă, în poziția A, 20 µl din extractul cloroformic de probă și, după uscare, se suprapun 2,5 µl din soluția standard de aflatoxină B_1. Prezența aflatoxinei B_1 din probă este confirmată prin pulverizarea, pe cromatoplacă, a unei soluții de acid sulfuric diluat (1 : 1, v/v). Se examinează placa în U.V. și se observă virarea în galben a fluorescenței sportului de aflatoxină B_1, ceea ce confirmă prezența sa în produsul de analizat.

Observații

1) Se recomandă să se utilizeze această metodă dacă în produs se găsește o cantitate de aflatoxină B_1, a cărei fluorescență să prezinte o intensitate comparabilă cu aceea a standardului de 2,5 µg aflatoxină B_1.

2) Metoda se pretează și pentru cercetarea aflatoxinelor B_2, G_1, G_2, utilizînd standardele corespunzătoare.

4. Metodă cromatografică în strat subțire pentru determinarea mai multor micotoxine (după Preda)

Principiu

Aflatoxinele B_1, B_2, G_1, G_2, Ochratoxinele, Zearalenona, Sterigmatocistina, Diacetoxiscirpenolul se extrag din produsul de analizat cu amestec metanol : apă. Extractul este delipidat, purificat pe coloană și supus cromatografiei în strat subțire. Spoturile fluorescente în U.V. sînt apreciate prin comparare vizuală cu spoturile standard.

Reactivi și materiale

1. Metanol. 2. Sulfat de sodiu anhidru. 3. Cărbune activat. 4. Izooctan (sau hexan). 5. Cloroform. 6. Toluen. 7. Acetat de etil. 8. Acid formic. 9. Acid azotic (toți reactivii trebuie să fie p.a.). 10. Standarde de micotoxinele respective, în concentrație de 3,8 μg/ml. 11. Lampă de U.V. (365 și 254 nm). 12. Coloane cromatografice cu lungimea de 20 cm și diametrul interior de 25 mm, în care s-au introdus : un strat de vată de sticlă, apoi 10—12 g silicagel (60 Merck pentru coloană), și, în fine, 3 g sulfat de sodiu anhidru.

Modul de lucru

Se agită mecanic, timp de 10 minute, 20 g produs de analizat bine omogenizat, cu 50 ml amestec metanol : apă (90 : 10). Se culege supernatantul. Se repetă operația de trei ori, culegîndu-se de fiecare dată supernatantele, care se reunesc și se filtrează. Filtratul se agită timp de 5 minute cu 5 g sulfat de sodiu anhidru și 1 g cărbune activat, se filtrează și se spală filtrul cu soluție metanol : apă (90 : 10). Se delipidează filtratul prin agitare, în pîlnie de separare, de trei ori cu cîte 50 ml izooctan sau hexan. Fazele izooctanice (hexanice) se îndepărtează. Fazele metanolice se purifică prin trecere prin coloană cromatografică. Eluarea coloanei se face cu metanol iar eluantul, care nu trebuie să depășească 30 ml, se concentrează la rotavapor (temperatura maximă 60°C). Reziduul obținut se reia cu 1 ml cloroform.

Se depun pe cromatoplacă (20 × 20, activată o oră la 110°C) 4 spoturi din probă (P) de cîte 20 μl extract cloroformic, intercalate cu cele 8 standarde de aflatoxine (B_1, B_2, G_1, G_2), ochratoxină (O), zearalenonă (Z), sterigmatocistină (S) și diacetoxiscirpenol (D), în următoarea ordine :

$$B_1 \quad P \quad B_2 \quad G_1 \quad P \quad G_2 \quad O \quad P \quad Z \quad S \quad P \quad D$$

Concentrațiile standardelor vor fi :

— aflatoxinele B_1 și B_2 = 5 ppb
— aflatoxinele G_1 și G_2 = 10 ppb
— ochratoxina = 5 ppb
— zearalenona = 10 ppb
— sterigmatocistina = 5 ppb
— diacetoxiscirpenolul = 10 ppb

Developarea se face cu sistemul : toluen : acetat de etil : acid formic (60 : 32 : 8, v/v). Timpul de developare este de 65 minute la 25°C și presiunea de 758 mmHg, iar cursa developării, 15 cm.

Scanned with OKEN Scanner

Revelarea se face prin vizualizare la $\lambda = 365$ nm și 254 nm, cînd se observă spoturi, ale căror caracteristici sînt prezentate în tabelul 31.

Tabelul 31

Caracteristicile spoturilor micotoxinelor

Micotoxina	*Culoarea spoturilor*		*Rf*
	254 nm	*365 nm*	
Aflatoxina G_2	albastru-verzui	albastru-verzui	0,14
Aflatoxina G_1	albastru-verzui	albastru-verzui	0,20
Aflatoxina B_2	albastru-violet	albastru-violet	0,22
Aflatoxina B_1	albastru-violet	albastru-violet	0,27
Ochratoxina	albastru	albastru	0,52
Zearalenona	galben-verzui	—	0,69
Sterigmatocistina	roșu	roșu	0,74
Diacetoxiscirpenolul	verde-gălbui	—	0,90

După pulverizarea cromatoplăcii cu acid azotic apar următoarele modificări:

— la $\lambda = 365$ nm, afetoxinele virează în galben, ochratoxina, în verde, sterigmatocistina, în portocaliu;

— la $\lambda = 254$ nm, zearalenona și diacetoxiscirpenolul virează în galben-verde.

Limitele de sensibilitate în evaluarea acestor opt micotoxine sînt de 10 ppb pentru ochratoxină, zearalenonă, sterigmatocistină și diacetoxiscirpenol și de 5 ppb pentru aflatoxinele B_1, B_2, G_1, G_2 la $\lambda = 365$ nm.

II.8.2. HIDROCARBURILE POLICICLICE AROMATICE (HPA)

1. *Metoda cromatografică în strat subțire pentru determinare din aer (după Mănescu)*

Principiu

Hidrocarburile policiclice aromatice se extrag cu un solvent adecvat, se separă prin cromatografie în strat subțire și se identifică prin fluorescența manifestată în U.V. În aceleași condiții, se poate doza 3,4-benzpirenul, utilizînd etaloane pentru trasarea curbei de etalonare.

Reactivi și materiale

1. Solvent de extragere. Benzen : eter de petrol (1 : 1); 2. Solvent de migrare. Benzen : ciclohexan (1 : 4); 3. Cromatoplăci 20 × 20 cm, activate 10 minute la 110°C.

Recoltarea probelor

Se aspiră aerul printr-un filtru cu porozitate foarte fină (filtru de membrană), fixat pe un suport. Volumul de aer necesar este de ordinul miilor de metri cubi.

Modul de lucru

După recoltare, se introduce filtrul în cartușul unui aparat Soxhlet și se extrage cu benzen : eter de petrol (1 : 1) timp de 2 ore. Extractul se eva-

poră în vid pînă la un volum de 3 – 5 ml. Concentratul se spotează pe cromatoplacă în paralel cu etaloanele. Migrarea, în tancul cromatografic în care s-a introdus benzen : ciclohexan (1 : 4), durează aproximativ o oră. După uscare se deosebesc, la o lampă de U.V., în raport cu fluorescența apărută, următoarele hidrocarburi policiclice aromatice : 3,4-benzpiren, albastru-închis-violet ; antracen, verzui ; fenantren, violet ; fluoren, roșu ; piren, verzui.

Pentru determinarea cantitativă a 3,4-benzpirenului, se raclează pata de pe cromatogramă corespunzătoare 3,4-benzpirenului, se solubilizează într-o cantitate cunoscută de benzen și, după decantare, se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 370$ nm în cuva de 1 cm, față de benzen. Se procedează identic pentru etaloanele de 3,4-benzpiren de pe cromatoplacă. Cu valorile extincțiilor obținute pentru etaloane se trasează curba etalon. Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a 3,4-benzpirenului, în μg, în probă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în μg 3,4-benzpiren la m^3 aer :

$$\mu g \text{ 3,4-benzpiren}/m^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația 3,4-benzpirenului, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în m^3.

2. *Metoda cromatografică pe hîrtie pentru determinarea semnificativă din produse alimentare (după Institutul de Igienă Iași)*

Principiu

Hidrocarburile policiclice aromatice se extrag cu un solvent adecvat, se separă prin cromatografie pe hîrtie, se identifică și se evaluează semicantitativ prin fluorescența manifestată în U.V.

Reactivi și materiale

1. Sistem de migrare : eter de petrol : metanol : ulei de vaselină (3 : 4 : 1) ; 2. Ulei de vaselină 10% în eter de petrol (se prepară extemporaneu) ; 3. Hîrtie de filtru Whatman W 1 sau 2 (benzi de 35 × 4 cm). Lampă de U.V. (254 nm și 366 nm).

Prepărarea probelor

Se extrag 250 g produs alimentar bine mărunțit cu un volum egal de etanol sau eter de petrol, timp de 25 minute, agitînd periodic. Se separă faza organică și se repetă extragerea încă de două ori, cu volume mai mici de solvent. Extractele organice reunite se concentrează prin distilare la bec de 25 W sau prin evaporare sub nișă pînă la un volum de 20—25 ml.

Extragerea poate avea loc (în raport cu produsul de analizat) și în aparatul Soxhlet, timp de 4 ore, cu diclormetan. Extractul organic se concentrează ca mai sus.

Modul de lucru

Se introduce, într-un cristalizator mic, uleiul de vaselină 10% în eter de petrol. Se trec benzile de hîrtie prin soluție, printr-o mișcare rapidă, apoi se usucă la temperatura laboratorului.

Se aplică, cu o micropipetă, un spot de 0,5 cm pe o bandă de hîrtie astfel tratată. Pe benzi similare se aplică, din soluția standard de 3,4-benzpiren, spoturi de 0,5 ; 1,0 ; 1,5 și 2,0 micrograme 3,4-benzpiren.

Migrarea se efectuează în bacul de cromatografie descendentă (50×20×50 cm) prevăzut cu capac etanș, cu sistemul de migrare eter de petrol : metanol : ulei de vaselină (3 : 4 : 1), timp de 4—5 ore, lăsîndu-se ca sistemul de migrare să străbată banda de hîrtie pînă la 1—2 cm de extremitatea inferioară. Se usucă benzile la temperatura laboratorului. Se expun benzile la lampa de U.V. la $\lambda = 254$ nm și 366 nm, cînd se observă spoturi, ale căror caracteristici sînt prezentate în tabelul 32.

Tabelul 32

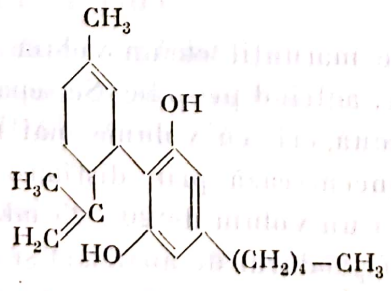
Caracteristicile spoturilor unor HPA

Hidrocarbura policiclică aromatică	*Culoarea spoturilor*		*Rf*
	254 nm	*366 nm*	
3,4-benzpiren	violet	albastru	0,26
Piren	albastru-deschis	alb	0,38
Crizen	violet	albastru	0,0
Coronen	verde	verde-gălbui	0,0

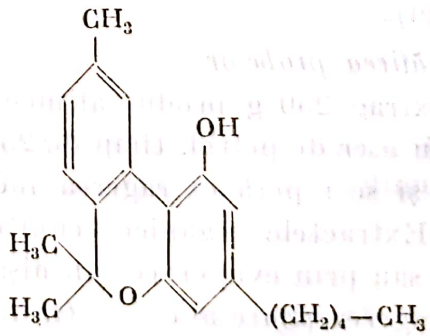
Mărimea și intensitatea culorii spotului dat de probă se compară vizual cu acelea ale spoturilor etalon. Limita minimă fe detecție este de 0,5—1,0 μg/probă.

II.8.3. CANNABIS

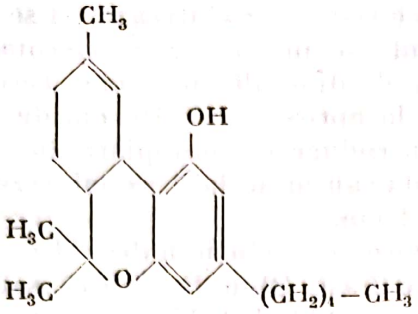
Principalii principii activi (cannabinoizi) din Cannabis sativa, var. indica, sînt următorii :



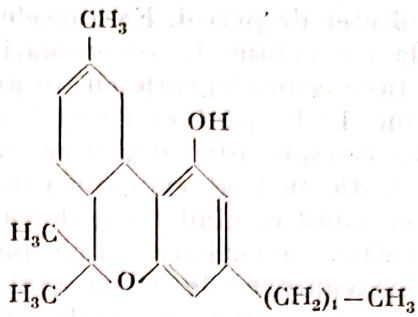
Cannabidiol
(CBD)



Cannabinol
(CBN)



(—) Trans Δ^9-tetrahidrocannabinol (Δ^9-THC)



(—) Trans Δ^8-tetrahidrocannabinol (Δ^8-THC)

A. Izolare

Cannabinoizii se izolează din corpuri delicte (țigări, părți de plantă, amestecuri de pulberi etc.) prin extragere, de trei ori, cu benzen, eter de petrol sau n-hexan. Din materialul biologic se izolează cu aceeași solvenți, din mediu acid. Extractele reunite se trec printr-o coloană scurtă de Florisil (60—100 mesh). Eluatul este evaporat la sec sau, preferabil, concentrat la un volum mic.

B. Identificare

1. *Teste preliminare (fără izolare)*

a) *Reacția Duquenois (modificată) :* se introduc într-o eprubetă 1—2 mg produs de analizat, se adaugă 50—150 mg din amestec 1 p. metaldehidă și 99 p. vanilină, apoi 0,5—1,0 ml etanol și se încălzește pînă la dizolvarea amestecului de reactivi. Se adaugă, picătură cu picătură, 1—3 ml acid clorhidric concentrat. După un minut se adaugă 1—3 ml cloroform și se agită. Colorarea stratului cloroformic în roz-mov indică prezența cannabisului.

b) *Reacția cu Fast Blue B :* se plasează 1 mg produs de analizat deasupra a două benzi de hîrtie de filtru suprapuse. Se adaugă, picătură cu picătură, eter de petrol (fracțiunea care distilă între 40°C și 60°C), pînă cînd se umectează banda inferioară de filtru. Se îndepărtează banda superioară de filtru. Peste banda inferioară de filtru se plasează 0,1 mg din amestec de 1 p. sare de Fast Blue B și 100 p. sulfat de sodiu anhidru, apoi se adaugă o picătură de apă. Culoarea roșie pînă la violet indică prezența cannabisului.

2. *Reacții de culoare (pe reziduu sau concentrat)*

a) *Reacția Duquenois :* se triturează reziduul (concentratul) cu 2 ml reactiv Duquenois (acetaldehidă 0,5 ml, vanilină 0,4 g în 20 ml etanol, preparat extemporaneu) și 2 ml acid clorhidric concentrat, cînd apare o colorație verde, care virează lent în indigo, apoi în violet.

b) *Reacția Beam :* se tratează reziduul (concentratul) cu cîteva picături reactiv Beam (soluție de hidroxid de potasiu 5% în etanol), cînd apare o colorație violetă, care se intensifică prin încălzire pe baia de apă.

c) *Reacția Ghamrawy :* se tratează reziduul (concentratul) cu cîteva picături reactiv Wasicky (p. dimetilaminobenzaldehidă 0,065 g, acid sulfuric concentrat 5 ml, apă distilată 1 ml). La încălzire pe baia de apă apare o colorație purpurie, care virează în violet la adaos de apă.

3. *Cromatografie în strat subțire*

a) Se triturează 0,1 g rezină sau 0,5 g părți de plantă cu nisip purificat, se extrag cu 10 ml eter de petrol (pf. 60—80°C), apoi de încă două ori, cu

cîte 5 ml eter de petrol. Extractele eterice reunite se filtrează și se concentrează la un volum de aproximativ 1 ml. Se impregnează o cromatoplacă într-un tanc cromatografic cu un amestec de dimetilformamidă : tetraclorură de carbon (1 : 1), pînă ce frontul ajunge la aproximativ 16 cm de la bază. Se aplică un spot din concentrat și se introduce cromatoplaca într-un tanc cromatografic saturat cu vapori de ciclohexan și se lasă să migreze aproximativ 45 minute, cînd frontul atinge 12 cm.

Revelarea se realizează prin pulverizare cu : soluție hidroxid de potasiu-dibrombenzochinonăclorimină sau soluție Fast Blue B alcalin sau soluție vanilină-acid sulfuric. Rf-urile sînt : Cannabidiol 0,15, Cannabinol 0,45, Tetrahidrocannabinol 0,65.

Soluție KOH-dibrombenzochinonăclorimină : 1) hidroxid de potasiu 5% în etanol ; 2) 2-6-dibrom-p. benzochinonă-4-clorimină, 0,5% în etanol. Se pulverizează cu 1), se usucă și se pulverizează cu 2).

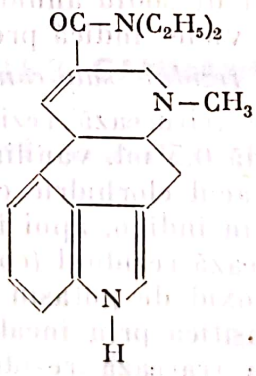
Soluție Fast Blue B alcalină : se dizolvă 0,1 g sare de Fast Blue B (ortodianisidină diazotată) în 100 ml soluție răcită de hidroxid de sodiu 2 N. Se prepară extemporaneu.

Soluție vanilină-acid sulfuric : se dizolvă 1 g vanilină în 100 ml acid sulfuric 80%. Se pulverizează cromatoplaca, apoi se încălzește cu un curent de aer cald.

b) Se extrage rezina sau planta cu un volum egal de eter de petrol (pf. 40—60°C). Se spotează 0,5 µl din concentrat. Solventul de migrare este toluenul, timpul de migrare, 30 minute. Revelarea se realizează prin pulverizare cu Fast Blue B în metanol, cînd apar spoturi portocalii pentru cannabidiol (Rf 0,86), violete pentru cannabinol (Rf 0,69) și roșii aprins pentru Δ^9-tetrahidrocannabinol (Rf 0,78).

Soluție Fast Blue B în metanol : se dizolvă 0,1 g sare de Fast Blue B în 100 ml amestec de apă : metanol (1 : 3). Se prepară extemporaneu.

II.8.4. DIETILAMIDA ACIDULUI LISERGIC (LSD)



A. Izolare

Dietilamida acidului lisergic (LSD) se izolează din mediu alcalin cu solvenți organici.

a) *Izolare din corpuri delicte.* 1) *Tehnica Dal Cortivo* (din zahăr, capsule gelatinoase, soluții brute conținînd drogul) : se dizolvă o cantitate de produs (de exemplu, o bucată de zahăr) în 20 ml apă, se alcalinizează la *p*H 8,5—9 cu

NaOH 2 N, se saturează cu NaCl și se extrage, timp de 10 minute, cu 15 ml cloroform, într-un agitator mecanic. Se repetă operația încă de două ori. Extractele cloroformice reunite se agită cu 5 ml HCl 0,01 N timp de 5 minute. După separarea fazelor, se îndepărtează faza cloroformică și se alcalinizează faza acidă, apoi se tratează din nou cu 15 ml cloroform. Faza cloroformică se evaporă la sec. Reziduul se reia în 1 ml metanol. 2) *Tehnica Hale-Taylor* (din zahăr, comprimate de aspirină, tranchilizante etc.) : se suspendă produsul în 10 ml apă, se acidulează cu HCl și se extrage de două ori cu cîte 5 ml cloroform. În fazele cloroformice se găsește LSD sub formă acidă. Se evaporă cloroformul. Reziduul se reia în 1 ml cloroform.

b) *Izolare din plasmă :* se saturează cu NaCl 5 ml plasmă, se alcalinizează cu 0,25 ml NaOH 2 N, se extrage, timp de 30 minute, într-un agitator, cu 25 ml heptan conținînd 2% alcool izoamilic. Faza heptanică se extrage din nou, timp de 15 minute, în agitator, cu amestec de 18 ml heptan și 1 ml HCl 0,004 N. Se îndepărtează faza heptanică și se utilizează faza acidă.

c) *Izolare din organe (bilă, sînge, urină) :* se omogenizează produsul biologic cu un volum de 5 ori mai mare de apă. Se iau 5 ml produs omogenizat într-un flacon cu dop rodat de 60 ml, se adaugă 25 ml heptan cu 2% alcool izoamilic, 0,5 ml NaOH N și 3 g NaCl. Se agită 30 minute la agitator. Se centrifughează și se introduc 20 ml fază heptanică într-o eprubetă de centrifugă, la care se adaugă 3 ml HCl 0,004 N. Se agită 10 minute la agitator. Se separă faza apoasă acidă.

d) *Izolare din urină (tehnica Noirfalise) :* 1) Se alcalinizează 10 ml urină cu Na_2CO_3 sau NaOH 2 N la *p*H 8 și se extrag de 3 ori cu cîte 20 ml eter. Se evaporă faza eterică. 2) Se acidulează 10 ml urină cu H_2SO_4 2 N la *p*H 3 și se extrag de 3 ori cu cîte 20 ml eter. Se evaporă eterul. În ambele cazuri, se reia reziduul în etanol.

e) *Izolare din soluții apoase (tehnica Noirfalise) :* se alcalinizează soluția apoasă la *p*H 11 cu Na_2CO_3 sau NaOH 2 N și se extrage cu acetat de izoamil. Se separa faza organică prin filtrare pe un filtru uscat. Se tratează filtratul cu 1 ml acid formic 15%, cînd LSD bază trece în faza acidă. Se repetă extragerea cu 0,5 ml acid formic. Se îndepărtează acidul formic în exsicator la vid la 30°C. Se reia reziduul în 3 picături de acid formic.

B. Identificare

1. *Reacție de culoare și fluorescență*

Se impregnează o bandă de hîrtie de filtru cu soluția de LSD. Se usucă hîrtia și se umectează cu cîteva picături de soluție de p. dimetilaminobenzaldehidă 0,5% în ciclohexan (dizolvat la cald). Se usucă și se expune în atmosferă de acid clorhidric, cînd apare o coloratie albastră. Dacă se execută reacția pe hîrtie impregnată de formamidă, se obține o fluorescență albastră chiar la cantități de 0,1 μg LSD.

2. *Cromatografie în strat subțire*

Se spotează soluția de LSD pe o cromatoplacă, în paralel cu un martor. Sistemele de migrare sînt : cloroform : metanol : acid acetic (47,4 : 47,5 : 5) sau dicloretan : metanol (90 : 10). Revelarea se realizează prin : pulverizare cu reactiv van Urk sau reactiv van Urk modificat, cînd se obțin spoturi albastre-violet ; expunere în lumina U.V., cînd se observă fluorescență albastră-violacee.

Scanned with OKEN Scanner

Reactiv van Urk : p. dimetilaminobenzaldehidă 0,5 g, acid clorhidric 5 ml, etanol 95 ml.

Reactiv van Urk modificat : p. dimetilaminobenzaldehidă 8 g, etanol cu 10% acid sulfuric concentrat 100 ml.

Observație

Identificarea LSD prezintă dificultăți deosebite, deoarece substanța este prezentă în cantități infime în produsele biologice și, de asemenea, este adesea amestecat, în corpurile delicte, cu cantități mult mai mari de alte substanțe (de exemplu, barbiturice) ; dacă acestea sînt solubile în solvenții utilizați la extragere (cloroform, eter etc.), prezența lor deranjează identificarea LSD.

II.8.5. DETERGENȚII ANIONICI

A. Identificare

1. *Diferențierea detergenților anionici, cationici, neionici*

a) La 10 ml apă de analizat se adaugă o picătură de soluție A și se agită. O coloratie roz-roșie indică prezența detergenților anionici, iar o coloratie portocalie, prezența detergenților cationici și neionici.

b) La 10 ml apă de analizat se adaugă 2 picături de soluție B și se agită. Se tratează apoi cu soluție de acid tartric 25%, picătură cu picătură, pînă la acidulare (față de turnesol). Se adaugă 2 picături de soluție C și se agită. În raport cu natura detergentului prezent, coloratia este :

— roz-violetă, care se dezvoltă complet pînă la 3 minute = detergenți anionici sulfonați ;
— galbenă slab = detergenți anionici sulfați ;
— galbenă opac = detergenți cationici ;
— verde închis = detergenți neionici.

c) La soluția de mai sus se adaugă în continuare 2 picături soluție A și se agită. În prezența detergenților anionici sulfonați, coloratia roz-violetă se menține, în prezența detergenților anionici sulfați culoarea virează la roșu-cireșiu, a detergenților cationici, la portocaliu, iar a detergenților neionici, la roșu-brun.

Soluția A : se dizolvă 2,5 g acid citric în 25 ml apă, se adaugă 0,2 g galben de metanil, se încălzește la fierbere 2 minute și se filtrează.

Soluția B : se dizolvă 10 g acid citric și 0,5 g benzidină în 10 ml apă, prin fierbere timp de 2 minute. Se dizolvă 15 g acid tartric în 15 ml apă, prin fierbere. Se amestecă cele două soluții, se lasă să se răcească și, la nevoie, se filtrează.

Soluția C : se dizolvă 1 g metavanadat de sodiu în 50 ml apă, prin fierbere. Soluția poate fi conservată timp de un an în recipiente brune, bine închise și rezistente la agenți chimici.

B. Dozare

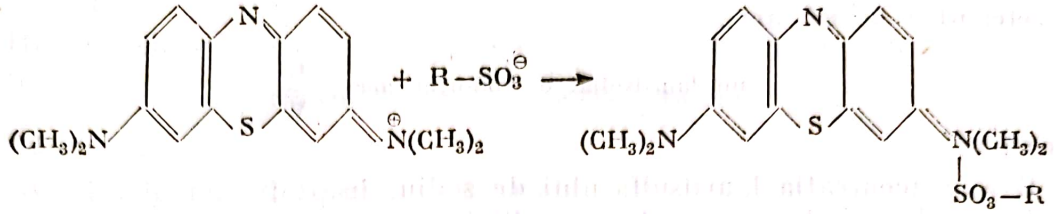
1. *Metoda spectrofotometrică (din aer)*

Principiu

Detergenții anionici formează cu albastru de metilen un compus colorat în albastru, prin reacția dintre gruparea anionică a detergentului $-(-SO_3^-$,

Scanned with OKEN Scanner

$-OSO_3^-$) cu gruparea cationică a colorantului. Compusul colorat este extractibil în cloroform, colorimetrabil:



Sensibilitatea metodei este de 10 μg detergent anionic.

Reactivi .

1. NaOH 1 N. 2. H_2SO_4 1 N. 3. Cloroform p.a. 4. Albastru de metilen. Se dizolvă 0,1 g albastru de metilen în 100 ml apă. La 20 ml din această soluție se adaugă, într-un balon cotat de 1 000 ml, 500 ml apă distilată, 6,8 ml acid sulfuric concentrat și 50 g fosfat monosodic monohidrat, se agită pînă la dizolvare și se aduce la semn cu apă. 5. Soluție de spălare. La 500 ml apă se adaugă 6,8 ml acid sulfuric concentrat și 50 g fosfat monosodic monohidrat, se agită pînă la dizolvare și se aduce la semn cu apă. 6. Soluție standard stoc de detergent anionic. Se cîntăresc 0,1000 g laurilsulfat de sodiu (sau altă substanță de referință), se aduc într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă în aproximativ 40 ml apă bidistilată fiartă proaspăt și răcită, apoi se completează la semn cu apă bidistilată (1 ml = 1 mg). 7. Soluție standard de lucru. Se dilucază soluția standard stoc cu apă bidistilată în proporție de 1 : 100 (1 ml = 10 μg laurilsulfat de sodiu).

Recoltarea probelor

Se aspiră 20—30 litri de aer, cu un debit de 1—2 litri/minut printr-un absorbitor care conține 10 ml apă distilată.

Modul de lucru

Se transvazează cantitativ conținutul absorbitorului într-o pîlnie de separare de 250 ml, reluînd de 2—3 ori cu cîte 5—10 ml apă distilată. Se completează volumul pînă la aproximativ 100 ml. Se adaugă 2 picături soluție de fenolftaleină, soluție NaOH 1 N cu picătura, pînă la virajul indicatorului în roz, apoi soluție de H_2SO_4 1 N pînă la decolorarea indicatorului. Se tratează soluția incoloră cu 10 ml cloroform și 25 ml albastru de metilen. Se agită și se lasă în repaus pentru separarea fazelor. Se separă faza cloroformică prin filtrare în altă pîlnie de separare. Se repetă extragerea din prima pîlnie de separare de două ori, odată cu 10 ml cloroform, a doua oară cu 5 ml cloroform, colectînd extractele cloroformice în pîlnia a doua. Dacă culoarea soluției apoase din prima pîlnie de separare dispare, se adaugă încă 25 ml soluție albastru de metilen. Extractele cloroformice reunite în pîlnia a doua sînt spălate prin agitare energică cu 50 ml soluție de spălare. După separarea fazelor, se colectează faza cloroformică prin filtrare. Se citește extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 640$ nm, în cuva de 1 cm, față de cloroform.

Curba de etalonare se întocmește între 50 și 200 μg (se iau 5—20 ml soluție standard de lucru și se aduc, în pîlnii de separare de 100 ml, apoi se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției probei se raportează la curba etalon, obținîndu-se concentrația C a detergentului anionic, în μg, în probă.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg laurilsulfat de sodiu (sau altă substanță de referință) la m^3 aer :

$$\text{mg laurilsulfat de sodiu/m}^3 \text{ aer} = \frac{C}{V}$$

în care :

C = concentrația laurilsulfatului de sodiu, în μg ;
V = volumul de aer recoltat, în litri.

Observație

Metoda nu este specifică. Interferă derivații sulfonați, carboxilați, fosforici, clorurile, azotații, tiocianații. Aminele aromatice pot determina scăderea intensității culorii finale.

2. *Metodă spectrofotometrică (din apă)*

Principiu

(același ca la metoda precedentă)

Reactivi

1. Soluție tampon de fosfat disodic *p*H 10. Se dizolvă 5 g fosfat disodic anhidru, Na_2HPO_4, în aproximativ 400 ml apă distilată, într-un balon cotat de 500 ml, se aduce la *p*H 10 cu NaOH 1 N și se completează la semn cu apă distilată. 2. Soluție neutră de albastru de metilen. Se cîntăresc 0,35 g albastru de metilen, se dizolvă în apă într-un balon cotat de 1 000 ml și se completează la semn cu apă distilată. 3. Soluție acidă de albastru de metilen. Se cîntăresc 0,35 g albastru de metilen, se dizolvă în aproximativ 500 ml apă într-un balon cotat de 1 000 ml, se adaugă 6,5 ml acid sulfuric concentrat și se completează la semn cu apă distilată. 4. Cloroform p.a. 5. Perhidrol. 6, 7. Soluții standard (v. metoda precedentă).

Modul de lucru

Se iau, într-o pîlnie de separare de 250 ml, 100 ml apă de analizat (sau un alicot, diluat la 100 ml cu apă distilată). Se adaugă 10 ml soluție tampon fosfat. Dacă apa conține sulfuri, polisulfuri sau tiosulfați, se adaugă și 1,5 ml perhidrol și se lasă în repaus 10 minute pentru realizarea oxidării. Se adaugă 5 ml soluție neutră de albastru de metilen și 15 ml cloroform. Se agită timp de un minut și se lasă să se separe fazele. Se trece faza cloroformică în a doua pîlnie de separare, în care se află 100 ml apă distilată și 5 ml soluție acidă de albastru de metilen. Se repetă extragerea din prima pîlnie cu încă 15 ml cloroform, se agită un minut și se trece faza cloroformică în a doua pîlnie de separare. Se agită 2 minute pîlnia a doua de separare, care conține ambele faze cloroformice, apoi se lasă în repaus pentru separarea fazelor. Se filtrează faza cloroformică într-un balon cotat de 50 ml printr-un tampon de vată îmbibat în cloroform introdus în tija pîlniei de separare. Se repetă extragerea din pîlnia a doua, cu 5 ml cloroform, colectînd faza cloroformică în același balon cotat și se aduce la semn cu cloroform. Se citește extincția probei la spectrofotometru, la $\lambda = 650$ nm, în cuva de 1 cm, față de cloroform.

Curba de etalonare se întocmește între 0,01 și 5,0 mg/litru (se iau 0,1 — 50 ml soluție standard de lucru, 1 ml = 0,01 mg, se completează la 100 ml

cu apă și se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se direct concentrația C de laurilsulfat de sodiu în mg la litru de apă.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg laurilsulfat de sodiu la litru de apă :

mg laurilsulfat de sodiu/litru apă = C

Observații

Avantajele metodei sînt următoarele :

a) Dozarea sumei detergenților anionici sulfonați și sulfați, nu însă și a produșilor de degradare (cu lanț alchilic sub 6 atomi de carbon), lipsiți de acțiune detergentă.

b) Determinarea direct în apă a detergenților anionici, fără extragere prealabilă, pînă la concentrații de 0,01 mg/litru.

c) Extragerea complexului colorat în mediu alcalin și apoi în mediu acid, împiedică interferarea fenolilor, fosfaților, sulfaților, nitraților, clorurilor, tiocianaților, substanțelor proteice. Sensibilitatea metodei este de 10 μg/litru apă.

II.8.6. DETERGENȚII CATIONICI

A. **Identificare**

1. *Diferențierea detergenților anionici, cationici, neionici* (v. Detergenții anionici)

2. *Reacții de precipitare (pentru bromura de cetilpiridiniu)*

a) Se tratează soluția apoasă diluată de analizat cu clorură mercurică 5%, cînd apare un precipitat alb, solubil în etanol.

b) Peste 4 ml acid sulfuric concentrat se adaugă o picătură de sulfat de cupru 5% și apoi o picătură de soluție de analizat, cînd lichidul se colorează în violet și apare un precipitat negru.

c) Se tratează soluția de analizat cu 2—3 picături acid azotic și cîteva picături azotat de argint 5%, cînd apare un precipitat alb-gălbui, greu solubil în amoniac.

3. *Reacții de culoare (pentru clorura de benzetoniu)*

— Acid sulfuric + formaldehidă : culoare portocalie (sensibilitate, 1 microgram) ;

— Reacția Vitali : /-/-/albastru (sensibilitate, 0,1 micrograme).

4. *Spectrofotometrie în U.V. și I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

Clorura de cetilpiridiniu în apă : 259

Clorura de benzetoniu în H_2SO_4 0,1 N : 265, 270, 277

Clorura de benzalconiu în apă : 250, 256, 262.

b) *I.R. (în KBr)*

Bromura de cetrimoniu A (1 480), B (1 462), C (961)

Clorura de benzetoniu A (1 240), B (1 505), C (1 120).

Scanned with OKEN Scanner

B. **Dozare**

1. *Metoda spectrofotometrică (din apă)*

Principiu

Amoniul cuaternar de la detergentul cationic formează, în mediu alcalin, cu colorantul anionic de tip metiloranj, $N(CH_3)_2-C_6H_4-N=N-C_6H_4-SO_3Na$ compuși colorați, extractibili în cloroform, colorimetrabili.

Reactivi

1. Metiloranj (p. dimetilaminoazobenzen sulfonat de sodiu) soluție apoasă 0,15%; 2. NaOH 10%; 3. HCl 2 N; 4. Cloroform p.a.; 5. Soluție standard. Se cîntăresc 0,1000 g detergent cationic și se aduc la 1 000 ml cu apă distilată (1 ml = 0,1 mg).

Modul de lucru

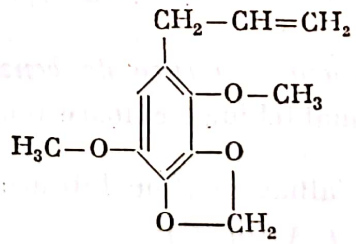
Se iau 50 ml apă de analizat într-o pîlnie de separare de 100 ml și se adaugă 0,5 ml soluție metiloranj, 1 ml NaOH, 20 ml cloroform. Se agită timp de 3 minute și se lasă în repaus pentru separarea fazelor. Se trece faza cloroformică în altă pîlnie de separare, se adaugă 5 ml HCl 2 N și se agită. După separarea fazelor, se îndepărtează faza inferioară cloroformică, iar faza superioară apoasă acidă, în care a trecut detergentul, colorată în roșu, este fotometrată. Se citește extincția la spectrofotometru, la $\lambda = 508$ nm, în cuva de 1 cm, față de martorul reactivilor (prima probă din scară).

Curba de etalonare se întocmește între 0 și 10 mg/litru (se iau 0—5 ml soluție standard, se aduc, în 6 pîlnii de separare, la 50 ml cu apă, apoi se prelucrează în condițiile probei). Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținîndu-se direct concentrația C a detergentului cationic, în mg la litru.

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg detergent cationic la litru apă: mg detergent cationic/litru apă = C

II.8.7. APIOLUL



A. **Izolare**

Apiolul, principiul activ din Petroselium sativum (pătrunjel), se izolează din mediu acid cu solvenți organici sau se antrenează cu vapori de apă.

a) *Izolare din urină:* la 50 ml urină, se adaugă 20 ml reactiv Courtonne, se agită și se filtrează. Filtratul se acidulează cu acid clorhidric la *p*H 2, apoi se extrage de două ori cu cîte 80 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se evaporă la sec la o temperatură sub 45°C. Se dizolvă reziduul în 1 ml etanol.

Reactiv Courtonne: se aduc 30 g acetat neutru de plumb la 100 ml cu apă. Se neutralizează cu acid acetic glacial și se precipită excesul de plumb prin agitare cu 0,2—0,5 g sulfat de sodiu, apoi se filtrează.

b) *Izolare din sînge:* se triturează în mojar 10 ml sînge și 1 ml acid tricloracetic 20%. Se lasă în repaus 15 minute și se filtrează. Filtratul se extrage de două ori cu cîte 30 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se evaporă la sec la o temperatură sub 45°C. Se dizolvă reziduul în 1 ml etanol.

B. **Identificare**

1. *Reacția Labat*

Se iau într-o eprubetă 2 ml acid sulfuric concentrat, 0,1 ml acid galic soluție 5% în etanol și 0,1 extract etanolic de analizat. Se menține amestecul într-o baie de apă la fierbere, exact un minut. În prezența apiolului apare o coloratie verde intens. Soluția prezintă un maximum la $\lambda = 660$ nm, un maximum de absorbție secundar la $\lambda = 605$ și o puternică absorbție optică în U.V. care se prelungește pînă la 410—420 nm. În paralel se execută o probă martor (2 ml acid sulfuric concentrat, 0,1 ml acid galic 5% și 0,1 ml etanol). Sensibilitatea reacției este de 15 μg/probă.

Reacția Labat nu este specifică, fiind dată și de safrol, ca și de derivații polioxietilenici, $[-O-(CH_2)_n-O-]$. De asemenea, poate da false reacții pozitive, dacă nu se utilizează eter etilic proaspăt distilat și dacă evaporarea are loc la peste 45°C, deoarece, sub influența oxidanților sau a căldurii, eterul etilic se transformă parțial într-un compus nevolatil, prezentînd gruparea $-O-CH_2-CH_2-O-$, care dă reacția Labat pozitivă.

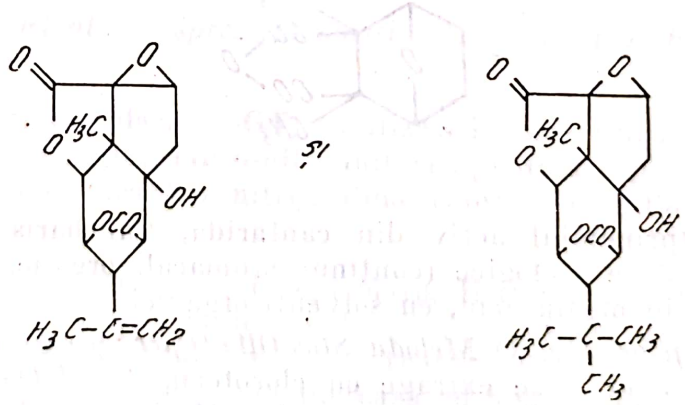
2. *Reacția Jorissen*

Soluția alcoolică de apiol, tratată cu apă de clor, apoi neutralizată cu amoniac, se colorează în roșu (culoarea este trecătoare).

3. *Reacția Ioanid-Borș*

Soluția alcoolică de apiol tratată cu acid sulfuric concentrat conținînd 1% vanadat de amoniu dă, la rece, o coloratie roșie-purpurie.

II.8.8. PICROTOXINA



A. **Izolare**

Picrotoxina — principiul activ din arbustul Anamirta cocculus — se izolează din produse biologice și corpuri delicte, din mediu acid sau alcalin cu solvenții organici.

B. **Identificare**

1. *Reacţii de culoare*

a) *Reacţia Minovici :* se tratează reziduul cu o picătură de acid sulfuric concentrat şi o picătură de soluţie alcoolică de anisaldehidă 20%. Se încălzeşte pe baia de apă, cînd apare o coloraţie violetă. Sensibilitatea reacţiei este de 50 μg.

b) *Reacţia Meltzer :* se tratează reziduul cu 2 picături de soluţie alcoolică de benzaldehidă 20% şi o picătură de acid sulfuric concentrat, cînd apare o coloraţie roşie. Sensibilitatea reacţiei este de 50 μg.

c) *Reacţia Langley :* se tratează reizduul cu cîteva cristale de azotat de potasiu şi o picătură de acid sulfuric concentrat, se omogenizează şi se neutralizează cu NaOH 30%, cînd apare o coloraţie roşie-cărămizie, trecătoare.

d) Se tratează reziduul cu 1—2 picături de acid sulfuric concentrat, apoi se adaugă o picătură de soluţie de dibromat de potasiu, 10%, cînd se obţine o coloraţie violetă, care virează la agitare la brun-murdar, iar prin repaus trece în verde.

e) Se tratează reziduul cu 2 picături de furfurol şi 2 ml acid sulfuric. Se încălzeşte pe baia de apă, cînd apare o coloraţie violetă.

2. *Spectrofotometrie în U.V. şi I.R.*

a) *U.V. (maxime)*

Picrotoxina în etanol 253, 258, 264

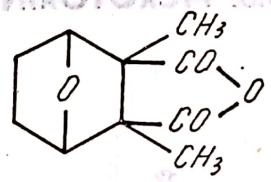
b) *I.R. (în KBr)*

Picrotoxina A (1 780), B (1 123), C (990)

3. *Test fiziologic*

Prin injectare de 0,2 mg picrotoxină la broască se observă convulsii şi o poziţie caracteristică : toracele umflat, membrele posterioare perpendiculare pe axa corpului.

II.8.9. CANTARIDINA



A. **Izolare**

Cataridina (principiul activ din cantarida, Cantharis vesicatoria) se izolează, din produse biologice (conţinut stomacal, organe, urină) sau din corpuri delicte, din mediu acid, cu solvenţi organici.

a) *Izolare din organe.* 1) *Metoda Stas-Otto-Ogier :* cantaridina se găseşte în lichidul apos acid şi se extrage cu cloroform. 2. *Metoda Dragendorff :* organele fin divizate, se alcalinizează cu NaOH şi se încălzesc pînă la formarea unui amestec omogen. Se extrage lichidul alcalin cu cloroform, de mai multe ori, pentru îndepărtarea substanţelor străine (cantaridina sub formă de sare nu trece în cloroform). Se acidulează cu acid sulfuric diluat, se adaugă

4—5 părți etanol și se încălzește cu refrigerent ascendent pentru trecerea acidului cantaridic în cantaridină. Se răcește, se filtrează și se extrage cloroform care se evaporă la sec.

B. **Identificare**

1. *Reacții de culoare*

a) Reziduul se tratează cu o picătură de formol 10% și 5 ml acid sulfuric concentrat și se încălzește ușor, cînd apare o coloratie brună, care virează la negru odată cu creșterea temperaturii.

b) Reziduul se tratează cu 5 picături de acid azotic fumans și se evaporă la sec. Peste reziduul cald se adaugă 5 picături reactiv vanilic (0,1 g vanilină se dizolvă în 10 ml etanol și se adaugă 6 ml acid clorhidric 25%) și se încălzește pe baia de apă, cînd apare o coloratie portocalie-roșie pînă la roșu-brun.

c) *Reacția Eboli:* reziduul de pe o sticlă de ceas se dizolvă în acid sulfuric concentrat, se încălzește, apoi se adaugă un cristal de dicromat de potasiu, cînd se produce efervescență și apare o coloratie verde intensă.

2. *Microcristalografie*

La un fragment din substanța de analizat (corp delict) plasat pe o lamă de microscop, se adaugă o picătură de amoniac și se evaporă la flacără mică, pînă la sec. Se observă la microscop cristale prismatice sau lame hexagonale sau grupe de cristale ascuțite.

3. *Examen microscopic*

Se pot pune în evidență, în conținut stomacal, la examen microscopic, resturi de elitre din cantaridă, caracterizate prin reflexe verzi metalice.

4. *Test fiziologic*

Reziduul se reia în cîteva picături de ulei și se aplică, cu un tampon de vată, pe plica cotului. Apariția iritației, eritemului și uneori a flictenelor indică prezența cantaridinei, chiar în doze de 0,1 mg.

II.8.10. GAMA-GLUTAMILPEPTIDAZA (γ-GT)

1. *Dozarea activității spectrofotometric (tehnica I.M.F. Cluj-Napoca)*

Principiu

Gama-glutamilpeptidaza (γ-GT) catalizează transferul acidului glutamic de la un donor (gama-glutamil-p-nitroanilina), pe un acceptor(glicil- glicina). În urma reacției se formează p. nitroanilina, colorată în galben ($\varepsilon mM = 9,9$).

Reactivi

1. Substrat, sub formă de comprimate, fiecare comprimat servind la 5 determinări în sistemul cinetic sau la 13 determinări în sistemul static; 2. Tampon tris-HCl; 3. Acid acetic. Se toarnă conținutul sticluței într-un cilindru gradat de 500 ml și se completează cu apă la 400 ml. Concentrația acidului acetic este de 1 N.

Pregătirea soluției de substrat. La 1,5 ml soluție tris-HCl se adaugă 6,5 ml apă, după care se introduce 1 comprimat, a cărui dizolvare are loc în mai puțin de un minut. Soluția poate fi păstrată la 25°C timp de 24 ore sau la 4°C timp de 4 zile.

Serul de analizat nehemolizat poate fi utilizat într-un interval de o săptămînă de la data recoltării, cu condiția de a fi păstrat la 4°C.

Modul de lucru

a) *Testul cinetic.* În cuva de 1 cm a spectrofotometrului se pipetează 1,5 ml soluție substrat în tris-HCl și 0,1 ml ser. Atît substratul, cît și serul trebuie preîncălzite la 25°C. La exact 1 minut după amestecare, se citește extincția la $\lambda = 405$ nm față de apă (se poate reduce diferența de extincție cînd aceasta este mai mare de 0,6, adăugînd în cuva martor 1—2 picături de soluție 1% de acid picric). Se repetă citirile la intervale de un minut timp de alte trei minute. Se calculează valoarea medie, $\Delta E/min$.

b) *Testul static.* Pentru fiecare determinare se pregătesc 2 tuburi de hemoliză în care se pipetează :

Eprubeta/reactivii	*Martor*	*Probă*
Substrat în tris-HCl (ml)	0,30	0,30
Ser (ml)	—	0,02
Se incubează amestecul la 25°C timp de 20 minute, apoi se pipetează :		
Acid actic 1 N (ml)	1,50	1,50
Ser (ml)	0,02	—

Se citește extincția probei față de martor la $\lambda = 405$ nm, în maximum o oră de la adăugarea ultimului reactiv.

Calcul

1 U.I. γ-GT este cantitatea de enzimă care catalizează transferul a 1 μmol acid glutamic de pe donor pe acceptor la temperatura de 25°C în timp de un minut. Activitatea enzimei se exprimă în U.I.

Test cinetic : $\gamma\text{-GT (U.I.)} = 1\,616 \times \Delta E_{405}/min.$

Test static : $\gamma\text{-GT (U.I.)} = 460 \times \Delta E_{405}/20$ min.

Interpretarea rezultatelor

Valorile normale sînt 6—28 U.I. la bărbați și 4—18 U.I. la femei.

Testul γ-GT este util în depistarea consumului excesiv de alcool într-o populație dată. În intoxicația etilică cronică, hiper-γ-GT se observă într-un procent important, de maximum 80%. Valoarea testului γ-GT capătă o semnificație deosebită atunci cînd, în prezența unei valori crescute, se repetă determinarea după minimum 5 zile de abstinență alcoolică. Scăderea γ-GT indică alcoolul drept cauză a hiper-γ-GT. Dacă însă valoarea se menține crescută și după sevraj, sînt responsabile de această creștere, alte cauze. Creșterea activității γ-GT în serul alcoolicilor se explică prin activarea sintezei proteice la nivel microzomal, datorită efectului inductor al alcoolului. Asemenea creșteri se observă și la alți inductori — de exemplu, fenobarbital — însă, pe cînd suprimarea alcoolului determină revenirea la normal a activității γ-GT, scăderea hiperactivității produsă de alți inductori este tardivă.

Scanned with OKEN Scanner

Testul γ-GT este un test deosebit de sensibil de retenție biliară, fără a prezenta modificări în leziunile osoase. Valori crescute se întîlnesc și în hepatite cronice, neoplasm primitiv sau metastazic al ficatului, insuficiență cardiacă cu stază hepatică sau în leziuni pancreatice.

Observații

1. Instrumente de tipul fotometrelor Pulfrich, FEK nu sînt adecvate. Se recomandă aparate de tipul spectrocolorimetrului Spekol, spectrofotometrelor VSU-1 sau VSU-2 sau orice fel de instrument cu monocromator. În toate aceste cazuri nu este necesară curba de etalonare. Pentru testul cinetic se recomandă instrumente prevăzute cu termostatare, cuplate la potențiometre înregistratoare.

2. În cazul cînd se lucrează la altă lungime de undă decît 405 nm, este necesară o curbă de etalonare cu p. nitroanilină.

3. Pentru seruri active ($\Delta E/min > 0,1$ în testul cinetic și respectiv $\Delta E/20$ min $> 0,06$ în testul static) se recomandă diluarea 1/5 cu ser fiziologic. Rezultatele se multiplică, în acest caz, cu 5.

Convertirea concentrațiilor gazelor și vaporilor, exprimați în volume, în concentrații exprimate în greutate și invers

(la 25°C și 760 mm coloană de mercur)

A. C. FIELDNER, S. H. KATZ, S. P. Kinney-Gas Masks for Gases Met in Fighting Fires. U. S. Bur Mines, Tech.Paper Nr. 248 (1921)

Gr. mol.	*1 mg/1 = părți la 1 milion*	*1 parte la 1 milion = mg/1*	*Gr. mol.*	*1 mg/1 = părți la 1 milion*	*1 parte la 1 milion = mg/1*
1	2	3	1	2	3
1	24 450	0,000041	26	940	0,001063
2	12 230	0,000082	27	906	0,001104
3	8 150	0,000123	28	873	0,001145
4	6 113	0,000164	29	843	0,001186
5	4 690	0,000204	30	815	0,001227
6	4 075	0,000245	31	789	0,001268
7	3 493	0,000286	32	764	0,001309
8	3 056	0,000327	33	741	0,001350
9	2 717	0,000368	34	719	0,001391
10	2 445	0,000409	35	699	0,001432
11	2 223	0,000450	36	679	0,001472
12	2 038	0,000491	37	661	0,001513
13	1 881	0,000532	38	643	0,001554
14	1 746	0,000573	39	627	0,001595
15	1 630	0,000614	40	611	0,001636
16	1 520	0,000654	41	596	0,001677
17	1 438	0,000695	42	582	0,001718
18	1 358	0,000736	43	569	0,001759
19	1 287	0,000777	44	556	0,001800
20	1 223	0,000818	45	543	0,001840
21	1 164	0,000859	46	532	0,001881
22	1 111	0,000900	47	520	0,001922
23	1 063	0,000941	48	509	0,001963
24	1 019	0,000982	49	499	0,002004
25	978	0,001022	50	489	0,002045

Scanned with OKEN Scanner

1	2	3	1	2	3
51	479	0,002086	84	291	0,00344
52	470	0,002127	85	288	0,00348
53	461	0,002168	86	284	0,00352
54	453	0,002209	87	281	0,00356
55	445	0,002250	88	278	0,00360
56	437	0,002290	89	275	0,00364
57	429	0,002331	90	272	0,00368
58	422	0,002372	91	269	0,00372
59	415	0,002413	92	266	0,00376
60	408	0,002454	93	263	0,00380
61	401	0,002495	94	260	0,00384
62	394	0,00204	95	257	0,00389
63	388	0,00258	96	255	0,00393
64	382	0,00262	97	252	0,00397
65	376	0,00266	98	249,5	0,00401
66	370	0,00270	99	247,0	0,00405
67	365	0,00274	100	244,5	0,00409
68	360	0,00278	101	242,1	0,00413
69	354	0,00282	102	239,7	0,00417
70	349	0,00286	103	237,4	0,00421
71	344	0,00250	104	235,1	0,00425
72	340	0,00294	105	232,9	0,00429
73	335	0,00290	106	230,7	0,00434
74	330	0,00303	107	228,5	0,00438
75	326	0,00307	108	226,4	0,00442
76	322	0,00311	109	224,3	0,00446
77	318	0,00315	110	222,3	0,00450
78	313	0,00319	111	220,3	0,00454
79	309	0,00323	112	218,3	0,00458
80	306	0,00327	113	216,4	0,00462
81	302	0,00331	114	214,5	0,00466
82	298	0,00315	115	212,0	0,00470
83	295	0,00339	116	210,8	0,00474

Scanned with OKEN Scanner

1	2	3	1	2	3
117	209,0	0,00479	150	163,0	0,00613
118	207,2	0,00483	151	161,9	0,00618
119	205,0	0,00487	152	160,9	0,00622
120	203,8	0,00491	153	159,8	0,00626
121	202,1	0,00495	154	158,8	0,00630
122	200,4	0,00499	155	157,7	0,00634
123	198,8	0,00503	156	156,7	0,00638
124	197,2	0,00507	157	155,7	0,00643
125	195,6	0,00511	158	154,7	0,00646
126	194,0	0,00515	159	153,7	0,00650
127	192,5	0,00519	160	152,8	0,00654
128	191,0	0,00524	161	151,9	0,00658
129	185,5	0,00528	162	150,9	0,00663
130	188,1	0,00532	163	150,0	0,00667
131	186,6	0,00536	164	149,1	0,00671
132	185,2	0,00540	165	148,2	0,00675
133	183,8	0,00544	166	147,3	0,00679
134	182,5	0,00548	167	146,4	0,00683
135	181,1	0,00552	168	145,5	0,00687
136	179,8	0,00556	169	144,7	0,00691
137	178,5	0,00560	170	143,8	0,00695
138	177,2	0,00564	171	143,0	0,00699
139	175,9	0,00569	172	142,2	0,00703
140	174,6	0,00573	173	141,3	0,00708
141	173,4	0,00577	174	140,5	0,00712
142	172,2	0,00581	175	139,7	0,00716
143	170,0	0,00585	176	138,9	0,00720
144	169,8	0,00589	277	138,1	0,00724
145	168,6	0,00593	178	137,4	0,00728
146	167,5	0,00597	179	136,6	0,00732
147	166,3	0,00601	180	135,8	0,00736
148	165,2	0,00605	181	135,1	0,00740
149	164,1	0,00609	182	134,3	0,00744

Scanned with OKEN Scanner

1	2	3	1	2	3
183	133,6	0,00748	217	112,7	0,00888
184	132,9	0,00753	218	122,2	0,00892
185	132,2	0,00757	219	111,6	0,00896
186	131,5	0,00761	220	111,1	0,00900
187	130,8	0,00765	221	110,6	0,00904
188	130,1	0,00769	222	110,1	0,00908
189	129,4	0,00773	223	109,6	0,00912
190	128.7	0,00777	224	109,2	0,00916
191	128.0	0,00781	225	108,7	0,00920
192	127,3	0,00785	226	108,2	0,00924
193	126,7	0,00789	227	107,7	0,00928
194	126,0	0,00793	228	107,2	0,00933
195	125,4	0,00798	229	106,8	0,00937
196	124,7	0,00802	230	106,3	0,00941
197	124,1	0,00806	231	105,8	0,00945
198	123,5	0,00810	232	105,4	0,00949
199	122,9	0,00814	233	104,9	0,00853
200	122,3	0,00818	234	104,5	0,00957
201	121,6	0,00822	235	104,0	0,00961
202	121,0	0,00826	236	103,6	0,00965
203	120,4	0,00830	237	103,2	0,00969
204	119,9	0,00834	238	102,7	0,00973
205	119,3	0,00838	239	102,3	0,00978
206	118,7	0,00843	240	101,9	0,00982
207	118,1	0,00847	241	101,5	0,00986
208	117,5	0,00851	242	101,0	0,00990
209	117,0	0,00855	243	100,6	0,00994
210	116,4	0,00859	244	100,2	0,00998
211	115,9	0,00863	245	99,8	0,01002
212	115,3	0,00867	246	99,4	0,01006
213	114,8	0,00871	247	99,0	0,01010
214	114,3	0,00875	248	98,6	0,01014
215	113,7	0,00879	249	98,2	0,01018
216	113,2	0,00883			

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 1 (continuare)

1	2	3	1	2	3
250	97,8	0,01022	275	88,9	0,01125
251	97,4	0,01027	276	88,6	0,01129
252	97,0	0,01031	277	88,6	0,01133
253	96,6	0,01035	278	87,9	0,01137
254	96,3	0,01039	279	87,6	0,01141
255	95,9	0,01043	280	87,3	0,01145
256	95,5	0,01047	281	87,0	0,01149
257	95,1	0,01051	282	86,7	0,01153
258	94,8	0,01055	283	86,4	0,01157
259	94,4	0,01059	284	86,1	0,01162
260	94,0	0,01063	285	85,8	0,01166
261	93,7	0,01067	286	85,5	0,01170
262	93,3	0,01072	287	85,2	0,01174
263	93,0	0,01076	288	84,9	0,01178
264	92,6	0,01080	289	84,6	0,01182
265	92,3	0,01084	290	84,3	0,01186
266	91,9	0,01088	291	84,0	0,01190
267	91,6	0,01092	292	83,7	0,01197
268	91,2	0,01096	293	83,4	0,01198
269	90,9	0,01100	294	83,2	0,01202
270	90,6	0,01104	295	82,9	0,01207
271	90,2	0,01108	296	82,6	0,01211
272	89,9	0,01112	297	82,3	0,01215
273	89,6	0,01117	298	82,0	0,01219
274	89,2	0,01121	299	81,8	0,01223
			300	81,5	0,01227

Scanned with OKEN Scanner

Concentrațiile maxime admise de substanțe toxice în atmosfera zonei de muncă

Norme republicane R.S.R. — 1975

Denumirea substanței	*Concentrație medie mg/mc*	*Concentrație maximă admisă (CMA) mg/mc*
1	2	3
Acetaldehidă	100	200
Acetat de amil și de izoamil	300	500
Acetat de benzoil	50	100
Acetat de butil și de izobutil	400	600
Acetat de celosolv (2-etoxi-etil-acetat)	200	400
Acetat de etil	500	800
Acetat de hexil sec.	P 150	250
Acetat de metil	P 400	600
Acetat de metil-celosolv	P 50	80
Acetat propil	400	600
Acetat de vinil	50	100
Acetil acetat de etil	100	200
Acetonă	1 000	1 500
Aceton-cianhidrină	P 15	25
Acetonitril	P 30	50
Acid acetic	20	30
Acid bromhidric	4	10
Acid butiric	20	30
Acid cianhidric	P 5	10
Acid clorhidric	—	10
Acid fluorhidric	1	2
Acid hidrazoic	1	2
Acid metacrilic	30	45
Acid sulfuric și anhidridă sulfurică	0,5	1,5
Acrilat de etil	50	80
Acrilat de metil	P 20	30
Acrilonitril	P 20	30
Acroleină	0,3	0,5
Alool alilic	P 3	6
Alcool amilic (izoamilic)	150	250
Alcool butilic (n-butanol) și izobutilic	200	300
Alcool decilic	150	250
Alcool etilic	1 000	2 000
Alcool furfurilic	100	200
Alcool heptilic	150	250
Alcool hexilic	150	250
Alcool metil-amilic (metil-izobutil-carbinol)	60	100
Alcool metilic	P 150	250
Alcool nonilic	150	250
Alcool cetilic	150	250
Alcool propilic (izopropilic)	400	600
Aldehidă cloracetică	—	3
Aldehidă crotonică	1	3
Amoniac	20	30
Anhidridă acetică	15	25
Anhidridă butirică	5	10
Anhidridă ftalică (vapori și aerosoli de condensare)	5	10
Anhidridă maleică (toxilică)	3	5
Anilină	P 4	6
Anisidină (aminoanisol) (0 și p)	0,3	0,5

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 2 (continuare)

1	2	3
Benzen	P —	50
Benzidină	P F_p	F_p
Benzine (carburanți)	500	700
Benzoat de etil	200	300
Bioxid de carbon	7 000	10 000
Bioxid de clor	0,1	0,3
Bioxid de sulf (anhidridă sulfuroasă)	10	10
Bisulfură de etil	400	500
Bromură de metil	P 50	80
Bromură de metilen	50	80
Butadien (1,3 (divinil)	P 1 500	2 000
Butil-amin	—	10
Butil-celosolv (butoxi-2-etanol)	P 150	250
n-Butil-glicidil-eter (BGE)	100	200
Butil-toluen-terțiar (p)	45	60
Camfor	1	3
Carbonat de dietil	700	1 000
Celosolv (etoxi-2-etanol)	P 400	600
Cetonă	0,5	1,5
Cianuri și cianogeni (exprimați în CN)	3	5
Chinonă	0,3	0,4
Ciclohexan	1 000	1 300
Ciclohexanol	150	200
Ciclohexanonă	100	200
Ciclohexanon-izo-oximă (caprolactamă)	5	10
Ciclohexen	1 000	1 200
Ciclohexilamină	50	75
Ciclopentadienă	100	200
Ciclopentadietil-tricarbonil-mangan	0,1	0,3
Ciclopropan	500	700
Clor	—	2
Clor-anilină (p)	P 5	10
Clor-benzen (mono)	100	150
Clor-brom-metan ($ClBr—CH_2$)	700	1 000
Clordan(1,2,4,1,5,6,7,8,8,-octa-cloro,3a,4,7,7a-tetra hidro-4,7-metano-indan)	0,3	0,6
Clorcian	—	1,0
Clordifenil (42 % clor)	P —	1
Clordifenil (54 % clor)	P —	0,5
Clor-naftaline (pînă la 3 Cl)	P —	2
Clor-naftaline (peste 3 Cl)	P —	1
Clor-nitrobenzen (p)	P —	1
Clor (1) — nitropropan (1)	50	75
Cloroform (triclormetan)	P 150	200
Cloropicrină	0,5	0,7
Cloropren (clor-butadienă)	30	50
Clor-stiren (mono)	75	100
Clor-toluen (o și p)	200	300
Clorură de acetil	2	5
Clorură de alil	3	6
Clorură de aluminiu	—	15
Clorură de benzoil	5	10
Clorură de benzil	5	8
Clorură de cianuril	—	1,0
Clorură de clor-acetil	10	20
Clorură de etil	1 500	2 000

Scanned with OKEN Scanner

1	2	3
Clorură de metil	100	200
Clorură de metilen (diclormetan)	500	700
Clorură de sulf	2	5
Clorură de sulfuril (SO_2Cl_2)	2	5
Clorură de tionil (Cl_2SO)	15	25
Clorură de tiofosforil ($PSCl_3$)	2	5
Clorură de vinil (clor-etilenă)	100	200
Cobalt (oxid de cobalt)	0,2	0,5
Crezol (toți izomerii)	P 15	20
DDT (1,1-triclor-2,2-di(p-clorfenil)etan	P 0,7	1
DDVP (0,0-dimetil-2,2-diclordivinil-fosfat)	P 0,5	1,5
Decaboran ($B_{10}H_{14}$)	P 0,1	0,3
Decalină (decahidro-naftalină)	200	300
Diaceton-alcool (4-hidroxi-4-metil-2-pentanonă)	150	250
Diaboran (B_2H_4)	P 0,5	1,5
Dibrom-etan (1,2)	P 150	200
Diciclohexil-amină	100	150
Diclor-benzen (o și p)	75	100
Diclor-difluor-metan (freon 12)	3 000	4 000
Diclor-etan (1,1)	100	150
Diclor-etan (1,2)	50	100
Dicloretilenă (1,1) (1,2)	500	300
Diclorhidrină	P 5	10
Diclor-monofluor-metan (freon 21)	3 000	6 000
Diclor-(1,1)-nitroetan-(1)	—	40
Diclor stiren	30	50
Diclor propan (1,2)	200	300
Diclor-tetrafluor-etan (freon 114)	5 000	7 000
Dietilamină	40	60
Difenilol propan	10	15
Difil (dinil, dowtherm) amestec de difenil și oxid de difenil)	2	4
Difluor-dibrom-metan	600	800
Diglicidil eter (DGE)	—	2
Diizobutil cetonă	150	250
Diizobutilen	2 000	2 500
Dimetilacetamidă	P 20	30
Dimetil-amină	10	15
Dinitro,orto-crezol (DNOC)	P 0,1	0,3
Dimetil-anilină(n-fenil-dimetil-amină)	P 10	20
Dimetil-benzil-amină	5	10
Dimetil-dioxan	150	250
Dimetil-formamidă	P 20	50
Dimetil-hidrazină (1,1)	P 0,7	1,5
Dinitrat de etilen glicol	P —	1
Dinitrobenzen	P 1	1,5
Dinitrofenol	P 0,7	1
Dinitrotoluen	P 1	1,5
Dinitro-fluor-crezol	5	10
Dioctil-ftalat sec (dietil-hexil-2-ftalat)	2	5
Dioxan (bioxid de dietilenă)	P 150	250
Epiclorhidrină	P 5	10
Etanolamină	P 2	5
Eter butilic	P 30	50
Eter diclor-dietilic (beta, beta)	P 40	60

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 2 (continuare)

1	2	3
Eter etilic	800	1 200
Eter-diclor-etil	P —	50
Eter metilic al dipropilen-glicolului	P 300	500
Eter propilic (izopropil-eter)	1 000	1 500
Etilamină	15	30
Etil-benzen	300	400
Etil-toluen	300	400
Etilen clorhidrină	P 10	15
Etilen-diamină	20	30
Etoxi-etil-metacrilat (beta)	100	200
Fenil-glicidil-eter (PGE)	75	100
Fenil-hidrazină	P 15	25
Fenil-metil-cetonă (acetofenonă)	100	200
Fenilen-diamină (p)	0,07	0,1
Fenol	P 10	15
Fluor	0,1	0,2
Fluor-acetat de sodiu (1080)	P 0,02	0,05
Fluorură de sulfuril	15	20
Fluoruri (exprimat în F)	1	2
Formaldehidă	—	4
Formiat de etil	200	300
Formiat de metil	150	250
Fosfor (galben)	0,05	0,15
Fosgen (clorură de carbonil)	0,2	0,5
Gaze lichefiate (conținut principal C_3-C_4)	1 200	1 500
Glicidol (2,3-epoxi-1-propanol)	50	100
Heptan (n)	1 500	2 000
Hexaclor-benzen	5	8
Hexaclor-etan	P 5	8
Hexametilen-diamină	3	5
Hexametilen-diizocianat	1	2
Hexan (n)	1 200	1 500
Hidrazină	P 0,7	1
Hidrocarburi alifatice (white-spirit, solvent nafta, ligroină, petrol lampant, motorină)	1 000	300
Hidrochinonă	1	2
Hidrogen arseniat	0,1	0,3
Hidrogen fosforat	0,2	0,5
Hidrogen seleniat	0,1	0,3
Hidrogen stibiat	0,2	0,5
Hidrogen sulfurat	10	15
Hidroxizi alcalini	1	3
Iod	0,5	1
Iodură de metil	15	25
Izoforonă (izo-acetofenonă)	50	100
Izoocten	500	700
Izopropil-benzen (cumen)	100	150
Izopropil-amină	7	10
Izopropil-glicidil-eter (IGE)	50	100
Metacrilat de metil	300	500
Metacrilat de n-butil	300	500
Metan	1 200	1 500
Metil-acetilenă (propin)	1 300	1 500
Metil-amină	15	20
Metil-anilină	P 7	10
Metil-butil-cetonă (hexanonă)	200	300

Scanned with OKEN Scanner

Anexa 2 (continuare)

1	2	3
N metil-carbamat-naftil-(carbaril, sevin)	2	5
Metil-celosolv (metoxi-2-etanol)	P 40	60
Metil-ciclohexan	1 200	1 500
Metil-ciclohexanol	300	400
Metil-ciclohexanonă	P 350	350
Metil-clor-acrilat	2	5
Metil-cloroform (1,1,1,-tricloretan)	1 000	1 500
Metil-etil-cetonă (butanonă 2)	200	300
Metil-etil-parathion	0,05	0,15
Metil-hexil-cetonă (octanonă)	100	200
Metil-izobutil-cetonă (hexanonă)	200	300
Metil-izobutinil-cetonă (oxid de mesitil)	100	200
Metil-parathion (tiosulfat de di-O-metil și O-p-nitro-fenil)	0,1	0,3
Metil-propil-cetonă (pentanonă)	250	300
Metil-sistox-cetonă (dimetil)	P 0,2	0,5
Metil-stiren (alfa)	250	350
Metilal (dimetoximetan)	1 500	2 500
Metilen bis fenilizocianat	—	0,15
Metoxiclor (1,1,1-triclor-2,2 di (p-metoxi-fenil)etan)	10	15
Mono-metil-hidrazină	P 0,1	0,3
Morfolină (oxid de dietilen imidă, tetrahidro-1,4-oxa-zină)	P 40	60
Naftalină	30	40
Naftil-amină (alfa)	P F_p	F_p
Naftil-amină (beta)	P F_p	F_p
Nicotină	P 0,3	0,6
Nitrat de izopropil	20	25
Nitrat de n-propil	75	100
Nitro-anilină (p)	P 3	5
Nitro-anisol (p)	5	10
Nitrobenzen	P 4	6
Nitro-butan	50	75
Nitroetan	100	150
Nitro-etil-benzen	P 15	20
Nitro-glicerină (trinitroglicerină)	P —	2
Nitro-metan	100	150
Nitro-naftalină (alfa)	20	30
Nitro-propan (1) (2)	50	75
Nitro-toluen (0)	P 20	30
Nitroso-dimetil-amină	P F_p	F_p
Octametil-pirofosforamidă (OMPA, Pestox 3, Schradan	P 0,3	0,6
Octan	1 500	2 000
Ozon	0,1	0,2
Oxiclorură de fosfor	2	5
Oxizi de azot (exprimați în NO_2)	—	10
Oxid de carbon	30	50
Oxid de difenil — clirat —	0,5	1,5
Oxid de etilenă	30	60
Oxid de propilenă	100	200
Pentaboran (B_2H_9)	P 0,05	0,15
Pentaclor-etan	200	250
Pentaclor fenol	P 0,5	1
Pentaclor-tiofenat de zinc	5	10
Pentaclorură de fosfor	0,5	1,5

Anexa 2 (continuare)

1	2	3
Pentafluorură de sulf	0,1	0,3
Pentan	2 000	2 400
Pentasulfură de fosfor	0,5	1,5
Pentaclor-etilen (tetraclor-etilen)	400	500
Perclor-metil-mercaptan	0,5	1,5
Piridină	10	15
Propan	1 400	1 800
Propil-glicidil-eter	100	200
Propiolactonă (beta)	P F_p	F_p
Seleniu	2	5
Seleniu (compuși)	0,1	0,2
Silicat de etil	500	800
Sistox (Demeton) (0,0-dietil-0,2-etilmercaptoetil-tiono-fosfat)	P 0,05	0,15
Solvent nafta (gudron de huilă)	200	300
Stiren monomer (fenil-etilen)	250	350
Sulf	—	15
Sulfamat de amoniu	10	15
Sulfat de dimetil	P 3	8
Sulfură de carbon	P 30	50
Tantal și oxid de tantal	5	10
TEDP sau sulfotep (tetra-etil-ditiono-pirofosfat)	P 0,1	0,3
Terebentină (esență de)	P 400	500
Tetrabromură de acetilenă	10	15
Tetraclor (1,1,2,2) (1,1,1,2) difluor (1,2) (2,2)-etan	3 000	4 000
Tetraclorură de carbon	P 50	100
Tetrahidrofuran	400	500
Tetralină (tetrahidro-naftalină)	200	300
Tetranitro-metan	3	6
Tetril (2,4,6-trinitrofenil-metil-nitramină)	P 1	1,5
Thiram (disulfură de tetrametiltiuram)	2	5
Toluen	300	400
Toluidină (o)	P 3	5
Toluilen-diamină	5	10
Toluilen-diizocianat (2,4)	0,1	0,3
Toxafen (camfenclorat 60 %)	0,3	0,5
Triclor-benzen	50	75
Triclor-etilenă	200	300
Triclor fenolat de cupru	0,5	1,5
Triclor-fluor-metan (freon 111)	4 000	5 000
Triclor-propan (1,2,3)	100	150
Triclor (1,1,2) trifluor(1,2,2)-etan(freon 113)	5 000	7 000
Triclorură de benzil (fenil-cloroform)	5	8
Tetraclorură de fosfor	2	5
Tricrezol-fosfat (o)	P 2	5
Trietil-amină	75	100
Trifluor-monobrom-metan	5 000	7 000
Triflorură de azot	20	30
Trifluorură de blor	—	3
Trifluorură de clor	—	0,4
Trimetilen-trinitramină (hexogen)	2	6
Trinitrofenol (acid picric)	P 0,08	0,15
Trinitrotoluen	P —	1
Vinil-toluen	300	400
Xilen	P 300	400
Xilidină	P 1	2

Scanned with OKEN Scanner

SERIEREA EXECUTĂRII ANALIZELOR TOXICOLOGICE DE URGENȚĂ

(după Meunier)

A. ANALIZE DE EXECUTAT ÎN MOD PRIORITAR

Sînge total ——————→ testul orientativ pentru alcool; dacă este pozitiv, dozarea alcoolemiei;

Urină ——————→ identificarea salicilaților

- pozitiv → dozarea salicilemiei
- negativ

Ser (plasmă) ——————→ dozarea salicilemiei

Ser ——————→ dozarea barbitemiei

B. ANALIZE COMPLEMENTARE DE EXECUTAT SISTEMATIC

URINA

Cercetarea medicamentelor cu caracter bazic

Extragere cu dicloretan după alcalinizare (NaOH)

- Tioxantene
- Fenotiazine*
- Dehidrodibenzazepine** și dibenzepina
- Dibenzazepine
- Dibenzcicloheptadiene
- Eibenztiazepine
- Amfetamine (psihostimulante și anorexigene)

Cercetarea medicamentelor cu caracter acid

Extragere cu eter după acidulare

- Cloraloză
- Carbamați (meprobamat)
- Gutetimidă
- Chinazolone (metaquavatona)
- Barbiturice (reacția Parri)

Cercetarea benzodiazepinelor psihotrope

Hidroliză clorhidrică la 100°C a benzodiazepinelor și a metaboliților lor

- Reacția de diazocuplare și examen la lampa Wood
- Cercetare prin C.S.S. dacă prima reacție este pozitivă

SÎNGE

Cercetarea unor medicamente cu caracter acid

Extragere cu eter (tehnica Griffon-Le Breton)

- Carbamați***
- Glutetimidă
- Cloraloză
- Acid salicilic și barbiturice (eventual)

LICHIDE GASTRICE

Cercetarea

- Barbituricelor
- Fenotiazinelor
- Dehidrodibenzazepinelor
- Acidului acetilsalicilic
- Carbamaților (în special) (studiul eliminării lor prin spălături gastrice)

Extragerea medicamentelor cu caracter acid, neutru și bazic, în vederea identificării lor prin C.S.S.

În cazul reacțiilor calitative *intens pozitive*:

* Dozarea în urină a fracțiunii metaboliților fenotiazinelor puțin polari: eventual, dacă se bănuiește o absorbție masivă de fenotiazine, dozarea fenotiazinemiei.

** Dozarea sistematică a dehidrodibenzazepinelor

*** Dozarea carbamatemiei

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ALEXEEVA M. V. *și colab.:* Determinarea substanțelor vătămătoare din atmosfera incăperilor industriale. I.D.T., București, 1954.
2. ANDREWS H. B.: Salicylate poisoning. American Family Physician 1973, *8*, 5, 102—106.
3. BANCIU D., OARDĂ M.: Intoxicațiile acute. Ed. Medicală, București, 1964.
4. BASELT R. C.: Disposition of toxic drugs and chemicals in man. (ed. II). Biomedical Publ. Davis, California, 1982.
5. BEJAN L., GORNIC GH.: Primul ajutor la locul accidentului și în timpul transportului. Ed. Facla, Timișoara, 1981.
6. BERGMEYER H. U.: Methods of enzymatic analyses (ed. II). Academic Press, New York, 1965.
7. CASTAGNOU R., GUYOTJEANNIN CH.: Traité de biologie appliquée. (t. VII). Toxicologie industrielle, medicamenteuse et agricole, Maloine, Paris, 1969.
8. CLARKE E.G.C.: Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and post-mortem material. (t. 1 și 2). The Pharmaceutical Press, London, 1971, 1975.
9. COTRĂU M., GHIMICESCU CAMELIA: Lucrări practice de toxicologie, Lit. I.M.F. Iași, 1968.
10. COTRĂU M.: Curs de toxicologie (IV). Lit. I.M.F. Iași, 1974.
11. COTRĂU M.: Curs de toxicologie (V). Lit. I.M.F. Iași, 1975.
12. COTRĂU M., BUTUC A.: Toxicologie minerală. Min. Ind. Chimice, București, 1980.
13. COTRĂU M., PROCA MARIA: Toxicologie, lucrări practice. Lit. I.M.F. Iași, 1983.
14. COTRĂU M., BUTUC A.: Toxicologia gazelor și vaporilor. Min. Ind. Chimice, București, 1982.
15. COTRĂU M.: Toxicologia substanțelor organice. Min. Ind. Chimice, București, 1985.
16. DAL CORTIVO L. A., BROICH J. R.: Ann. chem., 1966, 13, 1958—1960.
17. DIMITRIU C. GH., SCHACHTER A., MOGOȘ G.: Intoxicațiile acute. Fiziologie, clinică, tratament. Ed. Medicală, 1970.
18. DUMITRESCU H., ISVORANU Z.: Analiza chimică a substanțelor străine din alimente. Ed. Tehnică, București, 1965.
19. FEIGL F.: Spot tests in organic analysis. Elsevier, Amsterdam, 1966.
20. FRÉJAVILLE J. P. *și colab.:* Toxicologie clinique et analytique. Flammarion, Paris, 1971.
21. GALEA V. *și colab.*: Lucrări practice de toxicologie. Lit. I.M.F. Cluj, 1965.
22. GHIMICESCU GH.: Chimia și analiza alimentelor, băuturilor și condimentelor. Ed. Junimea, Iași, 1977.
23. HALE D., TAYLOR C.: Instrument News, 1967, 18, 6.
24. IOANID N. I.: Toxicologie, Ed. Did. Pedag., București, 1965.
25. IONESCU FL.: Metode moderne de măsurare a poluării aerului. Min. Ind. Chimice, București, 1975.
26. JOUGLARD J., POYEN D.: Concours méd., 1970, *92*, 42, 7621-35.
27. KAKAČ B., VELDELEK Z.: Handbuch der Kolorrimetrie. G. Fischer, Jena, 1966.
28. MANTA I. *și colab.*: Metode biochimice în laboratorul clinic. Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1976.
29. MĂNESCU S. *și colab.*: Chimia sanitară a mediului. Ed. Medicală, București, 1978.
30. MEUNIER J. *și colab.*: Ann. Biol. Clin., 1970, *28*, 5, 431—37.
31. MEUNIER J.: Toxicologie d'urgence. L'expansion scientifique française, Paris, 1972.
32. MOGOȘ GH.: Intoxicații acute. Diagnostic, tratament. Ed. Medicală, București, 1981.
33. NĂSTASE V., DRAGOMIR B.: Lucrări practice de chimie sanitară, Lit. I.M.F. Iași, 1977.
34. NEGUȚ GH. *și colab.*: Solanina, solanidina: aspecte generale, metodologia determinării din cartofi, în: A XVI-a Ses. Științ. Centrul de Ig. și Săn. Publică, Timișoara, 1983.
35. NOIRFALISE A.: J. Pharm. Belg., 1968, 7—8.
36. PEREGUD E. A. *și colab.*: Metode rapide de determinare a substanțelor toxice din aer. Ed. Tehnică, București, 1965.

Scanned with OKEN Scanner

37. POPA G.: Vademecum de urgențe medicale, Ed. Medicală, București, 1976.
38. POPA LIDIA *și colab.*: Lucrări practice de toxicologie. Lit. I.M.F. Cluj-Napoca, 1980.
39. POPESCU ALEX. *și colab.* (sub redacția): Aspecte clinice și de laborator în intoxicațiile acute (lucr. Simp. I. Nat. Toxicol. București, 1978). Min. Ind. Chimice, 1981).
40. STAN T., POPA I.: Toxicologie generală (lucrări practice). Lit. I.M.F. București, 1977.
41. STEPANOV A. V.: Chimie judiciară, Ed. Științifică, București, 1954.
42. STEWART C. P., STOLMAN A.: Toxicology. Academic Press, New York, 1961.
43. * * * Metode de investigare în sectorul de igiena muncii. Ministerul Sănătății, 1969, 1970.
44. * * * Metode de investigare în domeniul medicinii muncii. Ministerul Sănătății, 1973, 1975, 1976, 1978, 1982.
45. * * * Metode fizico-chimice pentru analiza pesticidelor. Ministerul Sănătății, 1977.
46. * * * Metode de determinare a poluanților din aer, Ministerul Sănătății, 1984.
47. * * * Metode de analiză toxicologică. Min. Ind. Chimice, București, 1981.
48. * * * Metode curente pentru analize de laborator clinic, Ed. Medicală, București, 1982.
49. * * * Norme republicane R.S.R. de protecția muncii. București, 1975.
50. * * * Farmacopeea română, Ed. Medicală, București, 1976.
51. * * * Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. E. Merck, A. E. Darmstadt.

Redactor de carte : dr. farm. ELENA HAȚIEGANU
Tehnoredactor : PRIMAVERA CÎMPEANU

Bun de tipar : 15.III.1988. Formatul : 16/70×100.
Hîrtie : scris I A 70×100. Coli de tipar : 25,75

Tiparul executat : I. P. „Oltenia" — Craiova.

Scanned with OKEN Scanner